O R S A Y
SERIE A
N° d'ordre :
1072

T H E S E

présentée

A L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES

par

Jean-Loup RISLER

ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES STRUCTURALES DE LA L-LACTATE DESHYDROGENASE (CYTOCHROME b_2) DE LA LEVURE : STRUCTURE QUATERNAIRE ET RELATIONS SPATIALES ENTRE L'HEME ET LA FLAVINE PROSTHETIQUES.

soutenue le 7 mars 1973 devant la Commission d'Examen

Mlle J. YON	Président
M. E. SHECHTER	Examinateurs
Mme F. LABEYRIE	

O R S A Y
SERIE A
N° d'ordre :
1072

T H E S E

présentée

A L'UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES

par

Jean-Loup RISLER

ETUDE DE QUELQUES PROPRIETES STRUCTURALES DE LA L-LACTATE DESHYDROGENASE (CYTOCHROME b_2) DE LA LEVURE : STRUCTURE QUATERNAIRE ET RELATIONS SPATIALES ENTRE L'HEME ET LA FLAVINE PROSTHETIQUES.

soutenue le 7 mars 1973 devant la Commission d'Examen

Mlle J. YON	Président
M. E. SHECHTER	Examinateurs
Mme F. LABEYRIE	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

J'ai eu la grande chance de pouvoir faire mes premières armes dans un laboratoire tout neuf, bien équipé et à la population très jeune. Il en résulte des facilités de travail et une atmosphère dynamique sans lesquelles une grande partie des résultats exposés dans ce mémoire n'aurait pu être obtenue. Que Monsieur P. Slonimski trouve ici l'expression de ma gratitude pour m'avoir accueilli au Centre de Génétique Moléculaire.

Je remercie vivement Mademoiselle J. Yon et Monsieur E. Shechter d'avoir bien voulu consacrer un peu de leur temps à l'examen de ce travail.

Madame F. Labeyrie a su diriger mes efforts avec une compétence, une patience et une indulgence dont je lui suis très reconnaissant. Son enthousiasme au moins égal au mien, et tout aussi juvénile, m'a été un stimulant précieux. La grande liberté qu'elle a bien voulu me laisser dans mon travail est une des raisons principales du goût que j'ai pris à la recherche.

Je remercie également Monsieur M. Iwatsubo pour m'avoir gentiment apporté son aide et prodigué ses conseils chaque fois que j'en ai eu besoin, en particulier pour les études de dichroisme circulaire et de fluorescence.

Monsieur V. Luzzati a été à l'origine des études cristallographiques que j'ai entreprises ; je le remercie des critiques, suggestions et encouragements qu'il m'a donnés, ainsi que des moyens de travail qu'il a bien voulu mettre au service des protéines. Claude Monteilhet a hérité de la pénible tâche de m'initier aux mystères des rayons X : je lui suis reconnaissant de son amicale patience, sans laquelle la loi de Bragg serait encore pour moi une calamité.

Mes remerciements vont aussi à Monsieur E.L. Benedetti qui a bien voulu accepter un intrus dans son laboratoire, s'intéresser à son problème et l'aider de sa grande compétence.

Ce travail est avant tout une oeuvre de collaboration : que tous mes camarades et amis (es) qui y ont participé sachent que je suis conscient de tout ce que je leur dois. Je n'oublie pas non plus mes compagnons de laboratoire: l'atmosphère survoltée qu'ils savent si bien créer m'a parfois évité de tomber dans une morne lassitude.

Je dois enfin remercier ma femme pour la compréhension qu'elle a su accorder à un mari parfois trop absorbé par son travail.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552718_0030

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE		1
CHAPITRE I	: MASSE MOLECULAIRE ET STRUCTURE QUATERNAIRE DU CYTOCHROME b_2.	5
I - 1	: INTRODUCTION	6
I - 2	: ARTICLE I : ETUDE PAR DIFFRACTION DES RAYONS X DES CRISTAUX DE CYTOCHROME b_2 ; DETERMINATION DE SA MASSE MOLECULAIRE.	8
I - 2 - 1	: Additif à l'article I.	14
I - 3	: ARTICLE II : ETUDE DES CRISTAUX DE CYTOCHROME b_2 PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.	17
CHAPITRE II	: ETUDE DES RELATIONS SPATIALES ENTRE L'HEME ET LA FLAVINE.	39
II - 1	: INTRODUCTION	40
II - 2	: ARTICLE III : FLUORESCENCE ET PHOSPHORESCENCE DU CYTOCHROME b_2 ; ORIENTATION RELATIVE DE L'HEME ET DE LA FLAVINE PROSTHETIQUES.	41
II - 3	: ARTICLE IV : ETUDE PAR DICHROISME CIRCULAIRE DES INTERACTIONS HEME-FLAVINE-PROTEINE DANS LE CYTOCHROME b_2.	48
II - 3 - 1	: Additif à l'article IV.	55
II - 4	: ETUDE DU CYTOCHROME b_2 PAR DICHROISME CIRCULAIRE MAGNETIQUE.	56
II - 4 - 1	: Introduction.	56
II - 4 - 2	: Article V : Etude du cytochrome b_2 par dichroisme circulaire magnétique.	59
CONCLUSION GENERALE		76
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES HORS ARTICLES.		82

INTRODUCTION

La présence d'une lactate déshydrogénase dans la levure de boulanger (Saccharomyces Cerevisiae) est connue depuis 1928 (1). Une vingtaine d'années plus tard, Dixon et ses collaborateurs (2) observent que cette activité enzymatique est liée à la présence d'un cytochrome, qu'ils nomment cytochrome b_2. C'est à Morton (3) et Boeri (4) que reviendra le mérite de montrer que la déshydrogénase proprement dite -c'est à dire l'enzyme agissant directement sur le lactate pour l'oxyder- et ce cytochrome sont en fait un seul et même enzyme, portant à la fois du protohème et de la flavine mononucléotide (FMN) comme groupes prosthétiques.

A peu près à la même époque, P. Slonimski étudie les mécanismes de la formation de la chaîne respiratoire chez la levure. Il montre alors (5) que l'activité lactate:cytochrome c réductasique, absente chez la levure cultivée en anaérobiose, est reversiblement inductible par l'oxygène. Un peu plus tard, il précise ces résultats (6) et observe que la levure contient non pas une, mais deux lactate déshydrogénases : l'une est formée au cours de la croissance aérobie, c'est le cytochrome b_2 dont nous venons de parler ; l'autre est découverte dans la levure anaérobie, elle oxyde le lactate en présence de ferricyanure mais pas en présence de cytochrome c. Avec F. Labeyrie et coll. (7) il montre que cette deuxième n'oxyde que le D-lactate tandis que la première est spécifique du L-lactate. Il sera enfin montré par Nygaard (8) qu'il existe également une D-lactate:cytochrome c réductase dans la levure aérobie. On peut noter que les deux D-lactate déshydrogénases sont des enzymes à Zn et FAD, tandis que la L-lactate déshydrogénase (cytochrome b_2) contient protohème et FMN.

L'étude de ces trois enzymes fut menée en France selon trois voies parallèles ; a) l'obtention de mutants "lactate négatifs" - c'est à dire de souches mutées ne croissant pas sur lactate en aérobiose, mais se multipliant sur d'autres sources de carbone non fermentescibles - aurait dû permettre de comprendre la fonction des deux lactate déshydrogénases de la levure aérobie. Malgré les tentatives de sélection menées au laboratoire (9), de telles souches ne purent être obtenues ; b) la régulation physiologique des trois

déshydrogénases fut étudiée en détail par M. Somlo (10-14) qui montra en particulier que, si les deux enzymes de la levure aérobie -dont le cytochrome b_2- sont inductibles par l'oxygène et le lactate, celui de la levure anaérobie est par contre un enzyme constitutif vis à vis de ces deux facteurs. Ces travaux permirent également de conclure à l'existence de différences fonctionnelles entre le cytochrome b_2 cristallisé et celui non purifié des extraits ; c) enfin, l'étude physico chimique de ces enzymes fut entreprise par F. Labeyrie et ses collaborateurs (15, 16).

Il ne fait aucun doute que, en ce qui concerne ces derniers travaux, le cytochrome b_2 fut grandement "favorisé". Les deux D-lactate déshydrogénases s'avérèrent en effet très instables et très difficiles à purifier, les taux de pureté obtenus étant de l'ordre de 5 à 10 %. Au contraire, Appleby et Morton (3) réussirent à obtenir le cytochrome b_2 sous une forme cristallisée raisonnablement stable, avec un bon rendement. A ces avantages décisifs pour l'étude structurale et fonctionnelle d'une protéine s'ajoutait l'intérêt présenté par les propriétés très particulières du cytochrome b_2 : cet enzyme est en effet très remarquable en ce qu'il possède deux groupes prosthétiques différents : protohème et flavine mononucléotide (FMN), en quantités égales (3). Il s'agit donc à la fois d'une déshydrogénase à flavine et d'un cytochrome. Contrairement aux lactate déshydrogénases des cellules de mammifères, le cytochrome b_2 n'utilise pas NAD comme cofacteur : ce co-enzyme est ici remplacé par le FMN prosthétique. Par ailleurs, la comparaison des potentiels d'oxydo-réduction ($E_{m\ 7}$) des différents systèmes impliqués dans la réaction catalytique (NAD/NADH = -320mV ; pyruvate/lactate = - 180 mV ; $FMN/FMNH_2(b_2)$ = - 18 mV ; cytochrome c ox/red = + 150 mV et ferri/ferrocyanure = + 350 mV) montre que le cytochrome b_2 favorise l'oxydation du lactate par le cytochrome c ou le ferricyanure, alors que les enzymes correspondants des mammifères favorisent la réduction du pyruvate par le coenzyme réduit, sauf dans des conditions où le rapport des concentrations lactate/pyruvate est très élevé (16, 17).

Bien évidemment, on s'est posé la question de savoir quels étaient les rôles respectifs des deux groupes prosthétiques ; le fait qu'ils soient tous deux réduits en présence de lactate semble indiquer que l'un et l'autre participent à la réaction catalytique, mais la compréhension du mécanisme réactionnel est rendue difficile par la stoechiométrie de la réaction : la réduction totale de la flavine (accepteur diélectronique) et de l'hème

(accepteur monoélectronique) demande 3 électron-équivalents, alors que l'oxydation du lactate n'en fournit que 2. Il semble que ce problème soit en voie d'être résolu puisque C. Blandin-Capeillère et R.C. Bray ont récemment mis en évidence la participation d'une flavine semiquinone au cours de la réduction des groupes prosthétiques par le lactate.

Il est maintenant établi que le FMN est l'accepteur primaire des électrons (18-20). Selon le schéma le plus probable, ces électrons seraient ensuite transmis à l'hème par un mécanisme intramoléculaire (21-22), puis enfin au cytochrome c (23, 24) qui est l'accepteur physiologique probable.

Les paramètres thermodynamiques et cinétiques correspondant à la réaction catalysée par le cytochrome b_2 ont donc fait -et font encore- l'objet d'études approfondies ; même si le transfert des électrons n'est pas connu dans le détail, un schéma plausible s'est dégagé peu à peu. Cependant, les données structurales concernant l'enzyme étaient moins nombreuses lors de mon arrivée au laboratoire ; puisque les deux groupes prosthétiques sont impliqués dans la réaction, une compréhension détaillée du mécanisme exige la connaissance de leurs relations spatiales, c'est à dire de leur distance et de leur orientation mutuelle. On a tenté de résoudre ce problème par l'étude du déflavo-cytochrome b_2, l'hèmoprotéine obtenue en dissociant réversiblement le FMN de l'holoenzyme (18). Il s'est avéré que l'hème ne semblait pas perturbé par l'enlèvement de la flavine puisque son potentiel d'oxydo-réduction, son spectre d'absorption optique (17) et ses signaux de résonance paramagnétique électronique (25) n'étaient pas significativement différents en présence ou en absence de FMN. Aucune interaction hème-FMN n'avait donc pu être mise en évidence, et j'ai poursuivi l'étude de ce problème en tentant de le résoudre au moyen d'autres méthodes spectroscopiques : fluorescence, phosphorescence, dichroisme circulaire naturel et magnétique.

La connaissance de la nature des ligands du fer hématinique est également un point important pour la compréhension des propriétés catalytiques d'une hémoprotéine. En effet, des enzymes aux fonctions aussi variées que la catalase, les péroxydases, l'hémoglobine et les cytochromes ont tous un point commun : l'hème prosthétique. Ce qui varie de l'un à l'autre, et par conséquent détermine leur spécificité, c'est la structure de la chaine polypeptidique entourant l'hème, qui conditionne à son tour la nature des ligands que les acides aminés fournissent au fer. L'hème du cytochrome b_2 étant un

composé "low-spin" (25) ne fixant ni CO ni CN (26), les deux positions de coordination 5 et 6 du fer sont occupées par des ligands protéiques ; des expériences de photooxydation ont permis à O. Groudinsky de montrer que l'un au moins de ces ligands est une histidine (27); des expériences récentes de résonance magnétique nucléaire (28) suggèrent en outre que les deux ligands protéiques du fer seraient deux histidines.

En ce qui concerne la masse moléculaire et la structure quaternaire du cytochrome b_2, il était admis depuis 1963 (29) que l'enzyme était un dimère de 183 000 daltons. Un ensemble de résultats obtenus au laboratoire ayant conduit à mettre en doute ces valeurs, j'ai examiné à nouveau cette question en m'appuyant sur la diffraction des rayons X et la microscopie électronique.

Pour plus de clarté, les résultats qui sont présentés ci-après ne le seront pas dans l'ordre chronologique de leur obtention, mais selon le schéma suivant : a) Détermination de la masse moléculaire et de la structure quaternaire du cytochrome b_2 ; b) Etude des relations spatiales entre l'hème et la flavine.

C H A P I T R E I

MASSE MOLECULAIRE ET STRUCTURE QUATERNAIRE DU CYTOCHROME b_2

I - 1 INTRODUCTION

La masse protéique par hème du cytochrome b_2 fut donnée par Appleby et Morton (30) dès 1959 ; ces auteurs trouvèrent qu'un hème et un FMN étaient associés à 80 000 g de protéine. Par la suite, Armstrong et coll. (29) déterminèrent par ultracentrifugation la masse moléculaire de l'enzyme, qui fut trouvée égale à 183 000 daltons (ce dernier point sera discuté dans l'article suivant). Il apparaissait ainsi que le cytochrome b_2 était un dimère portant deux hèmes et deux FMN. Un ensemble d'observations acquis au laboratoire conduisit à mettre en doute ces résultats : a) Baudras avait remarqué (31) que le rapport des absorptions Soret réduit/Soret oxydé donné par Morton et coll. (32) était trop élevé ; b) la valeur du coefficient d'extinction de l'hème du cytochrome b_2, déterminée par Appleby et Morton (30) (ε_{424} = 232 $mM^{-1}cm^{-1}$ pour l'hème réduit dans la bande de Soret), semblait être surestimée de 25 %. Cette observation provenait de l'étude d'un dérivé trypsique du cytochrome b_2 (noyau cytochromique b_2), composé bien défini portant 1 seul hème (33) : son coefficient d'extinction dans la bande de Soret n'est que 173 $mM^{-1}cm^{-1}$ (34), alors que l'absorbance d'une solution de cytochrome b_2 soumise à l'hydrolyse trypsique jusqu'à transformation complète en noyau cytochromique b_2 ne se modifie pas dans le spectre visible. c) D'après la composition absolue en acides aminés d'une protéine, on peut déterminer sa masse molaire si l'on sait sur quelle quantité de matériel (en fraction de mole) la détermination a porté. En se basant sur le coefficient d'extinction donné par Morton, Jacq et Lederer trouvèrent une masse molaire par hème de 66 000 à partir de leur détermination des acides aminés (35) au lieu des 80 000 donnés par les auteurs australiens.

Il apparut ainsi que le coefficient d'extinction du cytochrome b_2, ou la masse molaire par hème, ou les deux en même temps, étaient sujet à caution. Par ailleurs, la masse molaire de l'enzyme elle-même devenait douteuse ; en effet, la composition relative en acides aminés (indépendante de toute mesure de concentration) déterminée par Jacq et Lederer (35) permettait de calculer un volume partiel spécifique $\bar{v}$ de 0,74 cm^3/g, alors que Armstrong et coll. (29) avaient utilisé la valeur de 0,71 cm^3/g. Ceci conduisait à corriger leur masse de 183 000 daltons (obtenue par ultracentrifugation sans extrapolation à concentration nulle) à 210 000 daltons ; la nature dimérique du cytochrome b_2 devenait donc très douteuse.

Il était donc urgent a) de mesurer le volume partiel spécifique du cytochrome b_2 ; b) de déterminer à nouveau sa masse moléculaire. Les expériences d'Armstrong et coll. (29) suggéraient que l'enzyme en solution avait une nette propension à former des aggrégats ; par conséquent, il valait mieux éviter l'emploi de l'ultracentrifugation et de la diffusion de la lumière qui sont très sensibles à ce phénomène. Il fut alors suggéré par V. Luzzati d'utiliser la diffraction des rayons X, et de conduire les expériences sur les deux formes cristallines connues du cytochrome b_2 (36). Cette méthode présente le gros avantage de donner la masse molaire vraie (à un multiple entier près) et non pas une valeur moyenne en masse ou en nombre qui dépend de la présence d'aggrégats. Par ailleurs, l'existence de deux formes cristallines différentes permettait de réaliser deux séries de mesures indépendantes. Comme il est montré dans l'article suivant , la masse molaire du cytochrome b_2 fut trouvée égale à 235 000 ± 8 000, valeur supérieure de 28 % à celle précédemment admise.

I - 2 ARTICLE I

ETUDE PAR DIFFRACTION DES RAYONS X DES CRISTAUX DE CYTOCHROME b_2 ;

DETERMINATION DE SA MASSE MOLECULAIRE.

Molecular Weight and Quaternary Structure of Yeast L-Lactate Dehydrogenase (Cytochrome b_2)

3. X-Ray Diffraction Studies

C. Monteilhet and J. L. Risler

Centre de Génétique Moléculaire du Centre National de la Recherche Scientifique, Gif-sur-Yvette

(Received July 18/October 16, 1969)

An X-ray diffraction study has been performed by the powder technique on two crystalline forms of yeast cytochrome b_2. Type II (DNA-free) cytochrome b_2 crystallizes in the trigonal system, the parameters of the unit cell being $a = 168.2$ Å and $c = 112.0$ Å, whereas type I (DNA-containing) cytochrome b_2 crystallizes in the tetragonal system with $a = 99.1$ Å and $c = 87.0$ Å.

Measurement of the crystal density and of the partial specific volume of the protein (found to be 0.754 cm³/g at 25°) enables a precise determination of the molecular weight of cytochrome b_2 to be obtained. In this respect, the values 234600 ± 8000 and 235000 ± 10000 were found for type II and type I crystals respectively. These results, although in complete concordance, are quite different from the previously accepted value (approx. 180000 from sedimentation studies based on $\bar{v} = 0.71$ cm³/g). Space-groups and protein contents of the crystals show that this protein is composed of at least two, or even four, identical protomers.

For many years, bakers' yeast cytochrome b_2 (L-lactate:cytochrome *c* oxidoreductase) has been considered as a protein of molecular weight about 180000 bearing an equimolecular amount of protoheme and FMN as prosthetic groups [1,2]. However, as it is outlined in the accompanying papers, the conception of this molecular weight would appear to be erroneous. Therefore, since X-ray diffraction techniques provide an accurate and reliable tool for determining the molecular weight of proteins (see, for example, [3]), we performed an X-ray diffraction study by the powder technique on the crystalline enzyme in order to obtain information on molecular weight, subunit composition and molecular symmetry. Two crystalline forms were studied: (a) type I cytochrome b_2, containing about 5 % DNA; (b) type II (DNA-free) cytochrome b_2.

METHODS

Buffers

Buffer A = 50 mM sodium DL-lactate, 0.1 mM EDTA, 1 mM magnesium sulphate, pH 6.8. Buffer B = 50 mM sodium acetate, 0.1 mM EDTA, 1 mM magnesium sulphate, 2 mM triethanolamine, pH 6.8. Buffer C = 50 mM sodium DL-lactate, 0.1 mM EDTA, 2 mM triethanolamine, pH 6.8.

Enzyme. L-Lactate:cytochrome *c* oxidoreductase or cytochrome b_2 (EC 1.1.2.3).

Enzyme

Type I (DNA-containing) cytochrome b_2 was prepared from dried yeast (Springer) according to Morton and Shepley [4] and Spyridakis [5] and crystallized at 4° in the reduced form by dialysis against buffer A, or in the oxidized state against buffer B. The type II enzyme was obtained after removal of the DNA component [6] and crystallized in the reduced form by dialysis against buffer C.

X-Ray Experiments

The crystal suspension was centrifuged inside a thin wall quartz capillary tube and the crystals were thus densely packed in the pellet. The diffraction camera was of the Guinier type, using CuKα_1 or WLα_1 radiations, with a capillary-to-film distance of 125 mm. All diffraction experiments were carried out *in vacuo* at 4°. The exposure times lay in the range 24—48 hours. The spacings of the reflections on the films were measured with a Nikon shadowgraph. The cell parameters for both type I and type II crystals were determined from about 30 diffraction patterns.

Densities

The crystal densities were determined by the gradient tube method [7,8] using a polymer of high molecular weight (Ficoll, Pharmacia) dissolved in the crystallization buffer, and calibrated with

droplets of bromobenzene-xylene mixtures, the densities of which were accurately known by first weighing each component.

Partial Specific Volume

The partial specific volume of type II cytochrome b_2 was determined at 25° with a precision digital densimeter (Parr, Gratz-Austria—see [9]), calibrated with water and various ultra-pure organic liquids. A precision of 10^{-5} was commonly obtained on the measured densities. The enzyme sample was prepared by allowing 1 ml of protein solution to be dialyzed for 3 days against 1 liter of 0.2 M ammonium formate (pH 6.45, ionic strength 0.2) obtained by neutralization of formic acid by ammonia (pure reagent grades). After the density measurements, a known volume of this protein solution was dried at 110° *in vacuo* (10^{-2} torr) for at least 24 hours and then weighed, in order to obtain an accurate value of the protein concentration.

Molecular Weight

The molecular weight of cytochrome b_2 was calculated from the values of unit cell volume and crystal density. Let M_1 and M_0 be the weights of protein and water, respectively, per unit cell; $\bar{v}_1$ and $\bar{v}_0$ the partial specific volumes of protein and crystallization buffer; d, the crystal density; and V, the volume of the unit cell. Hence:

$$V = M_1 \bar{v}_1 + M_0 \bar{v}_0 \qquad (1)$$

$$V \cdot d = M_1 + M_0. \qquad (2)$$

Therefore, if there are n molecules per unit cell, the molecular weight M of one molecule is:

$$M = \frac{M_1 N}{n} = \frac{V.N.(\bar{v}_0 d - 1)}{n(\bar{v}_0 - \bar{v}_1)}. \qquad (3)$$

N being Avogadro's number.

RESULTS

Partial Specific Volume

The partial specific volume of type II (DNA-free) cytodrome b_2, at constant chemical potential (ionic strength 0.2), was found to be 0.754 ± 0.002 cm³/g at 25° (three determinations), and thus taken as 0.744 cm³/g at 4° [10].

Crystal Morphology

Crystals of type I cytochrome b_2 (Fig. 1) were always very small and had the appearance of square flat plates, while those of type II (Fig. 2) exhibited a trigonal symmetry; the hexagonal bipyramids reported previously by Morton and Shepley [4] were observed only on very small crystals, which in growing develop the trigonal appearance of Fig. 2. We always used crystals of type II as small as possible, but they could be as large as 0.5 mm when grown from dilute solutions.

X-Ray Diffraction of Type II Cytochrome b_2

The reflections of the diffraction patterns obtained with type II crystals could be indexed on a

Fig. 1. *Crystals of type I cytochrome* b_2, *grown at 4° by dialysis against 50 mM sodium* DL-*lactate, 0.1 mM EDTA, 1 mM magnesium sulphate, pH 6.8.* Microscope magnification 60

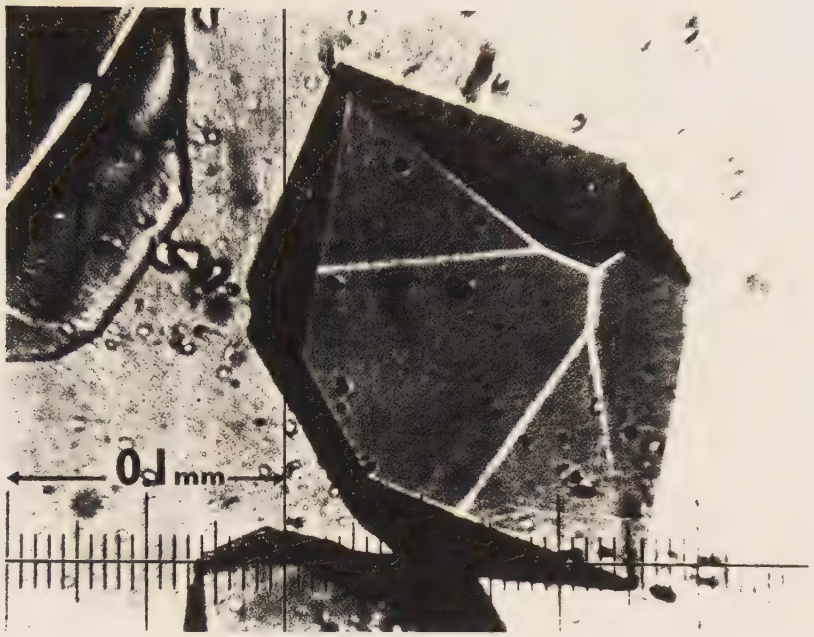


Fig. 2. *Crystal of type II cytochrome* b_2, *grown at 4° by dialysis against 50 mM sodium* DL-*lactate, 0.1 mM EDTA, 2 mM triethanolamine, pH 6.8.* Microscope magnification 186

Table 1. *Trigonal indexing of type II crystals*
In the left column are shown the observed spacings of the reflections on one typical diffraction pattern. In the right columns are listed the spacings calculated on the basis of a trigonal unit cell with $a = 168.2$ Å and $c = 112.0$ Å, and the corresponding indices. The relative intensities are not corrected. Other reflections with greater spacings are observable but are not listed because of the ambiguity on their indexing. Mean values were determined by the least square method. The uncertainties given in the text are the maximum deviation from the mean

Observed $\frac{2 \sin \theta}{\lambda} \times 100$	Relative intensity	Index hk · l	Calculated $\frac{2 \sin \theta}{\lambda} \times 100$
0.68	1000	10.0	0.68
	< 1	0.1	0.89
1.10	55	10.1	1.12
1.19	15	11.0	1.18
1.37	110	20.0	1.37
1.48	2	11.1	1.48
1.63	15	20.1	1.63
	< 1	0.2	1.78
1.83	15	21.0	1.81
	< 1	10.2	1.91
2.03	15	21.1 / 30.0	2.02 / 2.05
2.14	3	11.2	2.14
2.24	7	30.1 / 20.2	2.24 / 2.25
2.40	2	22.0	2.37
	< 1	31.0	2.47
2.52	3	22.1 / 21.2	2.53 / 2.54
2.63	1	31.1 / 0.3	2.62 / 2.67

trigonal lattice (Table 1) with $a = 168.2 \pm 0.7$ Å and $c = 112.0 \pm 0.8$ Å. The density of these crystals was 1.218 ± 0.002 g/cm³ at 4° (six determinations), and that of buffer C 1.004 g/cm³. The molecular weight of the protein was thus calculated from Equation (3). Table 2 shows that it is a multiple of 234600.

The morphology of trigonal crystals (Fig. 2) clearly indicates a 32 symmetry. Moreover, taking into account the absence of the 00.1 and 00.2 reflections, the possible space-groups are limited to $P3_112$ and $P3_121$ (and their enantiomorphs).

X-Ray Diffraction of Type I Cytochrome b_2

The reflections for type I crystals could all be indexed on one or the other of two tetragonal lattices, in both of which $a = 99.1 \pm 0.9$ Å, the other dimension being either $c = 87.0 \pm 0.8$ Å or $c = 65.1 \pm 0.5$ Å. The observed and calculated spacings are given in Table 3; it is clear that the two lattices are equally satisfactory. The measured crystal density was 1.250 ± 0.003 g/cm³ (six determinations) and that of the crystallization buffer A 0.9994 g/cm³. The calculated molecular weight of cytochrome b_2, shown in Table 2, was a multiple of 58750 in the first case ($c = 87.0$ Å) and 40000 in the second case ($c = 65.1$ Å). These last two values have been corrected for the presence of 5 % DNA [11], taking 0.57 cm³/g for its partial specific volume. The content of the associated DNA has not been redetermined, but an error of

Table 2. *Molecular weight of cytochrome* b_2

The molecular weight is calculated according to Eqn. (3) for each possible value of n. From comparison with hydrodynamic data, it is concluded that the molecular weight is 235000

Cytochrome b_2	V volume of unit cell	Crystal density	Assumed number of cytochrome b_2 molecules per unit cell	Site symmetry		Calculated molecular weight	Calculated water content of crystals by volume
	Å³	g/cm³					%
Type II	2744000	1.218	$n = 3$	2		469200	37
			$n = 6$	1		234600	
				P4 $P4_2$	P422 $P4_222$		
Type I	854000 ($c = 87.0$ Å)	1.250	$n = 1$	4	42	470000	32
			$n = 2$	2	4 or 222	235000	
			$n = 4$	1	2	117500	
			$n = 8$	—	1	58750	
	634000 ($c = 65.1$ Å)	1.250	$n = 1$	4	42	320000	32
			$n = 2$	2	4 or 222	160000	
			$n = 4$	1	2	80000	
			$n = 8$	—	1	40000	

Table 3. *Tetragonal indexing of type I crystals*

See Table 1 for explanation. The calculated spacings are listed for the two possible tetragonal lattices. The mean values of the cell parameters are $a = 99.1$ Å for both cases, c being either 87.0 Å or 65.1 Å. It is shown (see text) that the correct value is $c = 87.0$ Å

Observed $\frac{2 \sin \theta}{\lambda} \times 100$	Relative intensity	Index hkl	Calculated $\frac{2 \sin \theta}{\lambda} \times 100$	Index hkl	Calculated $\frac{2 \sin \theta}{\lambda} \times 100$
		($c = 87.0$ Å)		($c = 65.1$ Å)	
1.018	110	100	1.018	100	1.018
	<10	001	1.150		
1.441	1000	110	1.440	110	1.440
1.535	970	101	1.535	001	1.535
1.844	200	111	1.842	101	1.841
2.04	640	200	2.03	200	2.03
				111	2.10
2.27	630	210	2.27	210	2.27
		002	2.30		
	<10	201	2.33		
2.53	30	102	2.51	201	2.55
		211	2.54		
2.74	35	112	2.71	211	2.74
	<10	220	2.87	220	2.87
3.05	175	300	3.05	300	3.05
		202	3.07	002	3.07
	10	221	3.09		
3.23	140	310	3.22	310	3.22
		212	3.23	102	3.23
		301	3.26	221	3.26
3.42	50	311	3.41	112	3.39
		003	3.45	301	3.41

$\pm 20\%$ on this percentage would alter our calculated molecular weight for type I by only 1.3%, and therefore would not affect basically our discussion.

As regards the first possible tetragonal lattice ($c = 87.0$ Å), the reflections 002 and 003 coincide with other reflections, so that the absences of the 00l reflections are ambiguous. Under these conditions, several space-groups are possible: P4, $P4_2$, P422 and $P4_222$. For the second lattice ($c = 65.1$ Å) there is no systematic absence, and the space-group is either P4 or P422.

DISCUSSION

It had been found by earlier hydrodynamic measurements [2,12] principally performed in Morton's laboratory [2] on type I cytochrome b_2 that the molecular weight of the protein was about 180000. A number of methods were used: sedimentation velocity, equilibrium-sedimentation, approach-to-equilibrium and diffusion. In fact the results were highly dispersed due to the presence of agglomerates; moreover, the partial specific volume was taken to be 0.71 cm³/g, calculated on the basis of previous amino acid analyses [13]. A molecular weight of 183400 was given as the best estimate in these studies. Adopting the correct value of $\bar{v}_1$ (0.744 cm³/g at 4°), this approximate molecular weight should be corrected to 200000—210000. Some recent determinations performed in this laboratory [14] using Archibald's method give a value of about 215000. This figure is in agreement with the molecular weight observed in the trigonal (type II) crystals (six molecules per unit cell, molecular weight 234600 $\pm$ 8000, see Table 2) and with that obtained in the tetragonal crystals with $c = 87.0$ Å (two molecules per unit cell, molecular weight 235000 $\pm$ 10000, see Table 2). It should be emphasized that the X-ray data provide the true molecular weight, and not an average value: the diffraction methods are thus more reliable, especially in the case of proteins which have a pronounced tendency to agglomerate in solution.

The possible space-groups for trigonal crystals are $P3_112$ and $P3_121$, which both admit six equivalent positions; since there are six molecules per unit cell, the molecular symmetry cannot be appreciated. For type I crystals, there are two molecules per tetragonal unit cell ($c = 87.0$ Å). Hence, if the space-group is either P4 or $P4_2$, the molecule is a true dimer possessing a two-fold axis; if the space-group is P422 or $P4_222$, this molecule has a symmetry 4 or 222 and is a true tetramer. Therefore, the catalytically active cytochrome b_2, of molecular weight 235000, is composed of at least two identical protomers. Since the molecular weight per heme has been found to be 52300 by Jacq and Lederer, and 58600 by Pajot and Groudinsky (preceding papers), the protein must have four hemes, and thus four FMN, as prosthetic groups. It is clear, nevertheless, that the present data do not permit a choice to be made between a true tetramer or a pseudo-tetramer, formed by two distinct types of subunits.

Electron microscopy data for crystals types I and II have been given by Burgoyne *et al.* [15]. The electron micrographs of type II crystals cut perpendicularly to the c axis can be considered as a hexagonal honeycomb, which can be easily constructed according to the symmetry of the $P3_112$ and $P3_121$ space-groups. Moreover, the observed distance between the centers of two adjacent hexagons (approx. 150 Å) is consistent with $a = 168$ Å. However, the dimensions given for one cytochrome b_2 molecule ($92 \times 82 \times 26$ Å) would be consistent with a molecular weight of about 160000; the treatment of protein crystals for electron microscopy examination being very radical, a marked change in the protein conformation would not be surprising.

We are greatly indebted to Drs V. Luzzati, F. Labeyrie and M. Iwatsubo for their helpful criticisms and discussions, and to Miss A. di Franco for correcting the manuscript. This work has been supported in part by a grant from the Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique, Comité de Biologie Moléculaire.

REFERENCES

1. Appleby, C. A., and Morton, R. K., *Biochem. J.* 73 (1959) 539.
2. Armstrong, J. McD., Coates, J. H., and Morton, R. K., *Biochem. J.* 86 (1963) 136.
3. Tanford, C., In *Physical Chemistry of Macromolecules*, Wiley and Sons, New York-London-Sidney 1967, p. 58.
4. Morton, R. K., and Shepley, K., *Biochem. J.* 89 (1963) 257.
5. Spyridakis, A., unpublished observations.
6. Symons, R. H., *Biochim. Biophys. Acta*, 103 (1965) 298.
7. Low, B. W., and Richards, F. M., *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 1660.
8. Low, B. W., and Richards, F. M., *J. Am. Chem. Soc.* 76 (1954) 2511.
9. Stabineer, H., Leopold, H., and Kratky, O., *Monatsh. Chem.* 98 (1967) 436.
10. Elias, H. G., In *Methodes de l'ultracentrifugation analytique*, published by Beckman Instruments International, Geneva.
11. Appleby, C. A., and Morton, R. K., *Biochem. J.* 75 (1960) 258.
12. Baudras, A., and Labeyrie, F., In *Structure and Function of Cytochromes* (edited by K. Okunuki, M. D. Kamen and I. Sekuzu), University Park Press, Baltimore-Manchester 1968, p. 601.
13. Appleby, C. A., Morton, R. K., and Simmonds, D. H., *Biochem. J.* 75 (1960) 72.
14. Baudras, A., Labeyrie, F., and Filitti-Wurmser, S., unpublished observations.
15. Burgoyne, L. A., Dyer, P. Y., and Symons, R. H., *J. Ultrastructure Res.* 20 (1967) 20.

C. Monteilhet and J. L. Risler
Centre de Génétique Moléculaire du C.N.R.S.
F-91 Gif-sur-Yvette, France

I - 2 - 1 Additif à l'article I

En nous appuyant sur des expériences récentes d'ultracentrifugation réalisées au laboratoire (M. Mével-Ninio), nous avons donc pu établir que la masse molaire M du cytochrome b_2 était de 234 600 ± 8 000 dans les cristaux trigonaux et 235 000 ± 10 000 dans les cristaux quadratiques. Le bon accord entre ces deux résultats permet de regarder avec confiance la masse molaire M ainsi déterminée. Cependant, la valeur mesurée du volume partiel spécifique est utilisée dans les deux cas ; une erreur dans la détermination de $\bar{v}$ se répercuterait de façon identique sur les deux déterminations de M. Il est donc important de s'assurer de l'exactitude de la valeur de $\bar{v}$, et nous pouvons développer pour cela les arguments suivants : a) on détermine le volume partiel spécifique d'une protéine en mesurant la densité d'une solution de concentration connue. Pour cela, j'ai utilisé un appareil de conception très récente dont le principe est de mesurer la fréquence propre de vibration de la cellule de mesure. Cette fréquence dépend du poids du liquide qu'elle contient, et donc de sa densité. L'appareil a été testé et étalonné avant chaque mesure au moyen d'eau bidistillée et de liquides organiques ultra-purs. J'ai pu constater, au cours d'une période de plusieurs mois, que la précision et la reproductibilité de l'appareil étaient de l'ordre de 4.10^{-6}. Ainsi, la mesure des densités semble tout à fait sûre ; b) l'incertitude sur $\bar{v}$ dépend donc surtout de la précision avec laquelle est mesurée la concentration de la solution de protéine ; pour déterminer celle-ci, les solutions de cytochrome b_2 (dissous dans du formiate d'ammonium) ayant servi aux mesures de densité ont été partagées en plusieurs fractions de volumes connus, et amenées à poids sec constant. Pour cela, les différentes fractions ont d'abord été lentement séchées à 60°C pour éviter toute projection de liquide, puis les échantillons ont été portés à 110°C, en présence de P_2O_5, sous le vide d'une pompe à palettes. Ces échantillons étant pesés toutes les 24 heures, il a fallu en général 5 jours pour obtenir un poids constant ($\pm 10^{-2}$ mg pour un échantillon contenant de 10 à 20 mg de protéine). Pour une même série de mesures, l'incertitude expérimentale sur la concentration de cytochrome b_2 était de l'ordre de 0,6 %. Malgré toutes ces précautions, on peut imaginer que la protéine garde quand-même une certaine quantité d'eau, ce qui introduirait une erreur systématique non décelable. Si l'on suppose que les concentrations ont

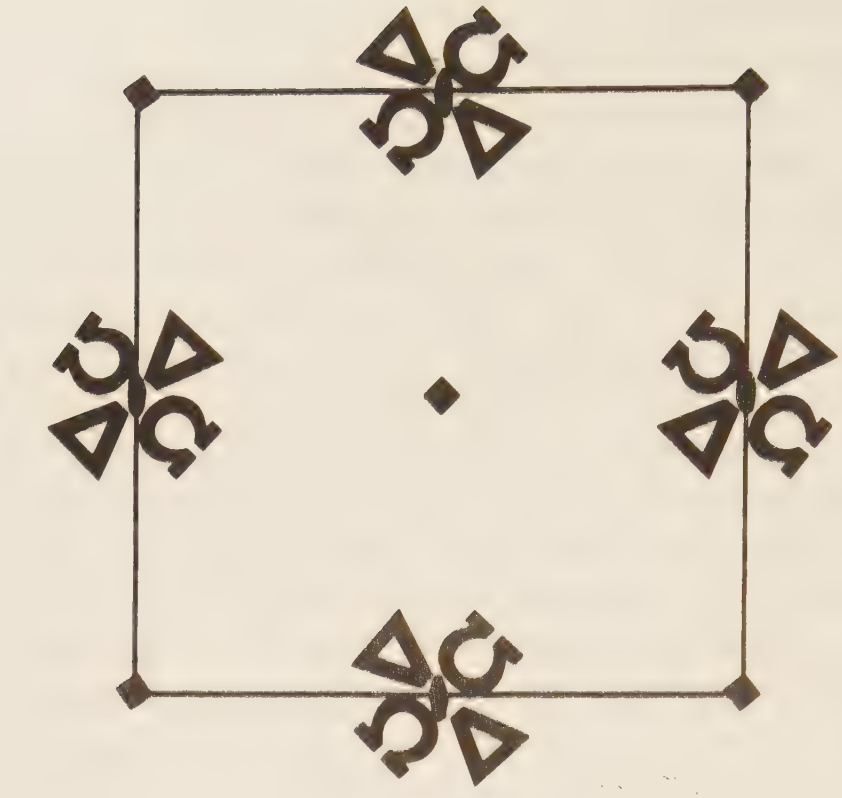
été en fait déterminées à 1 % près, un calcul d'erreurs montre que l'incertitude sur la valeur de $\bar{v}$ serait de 0,5 % -compte tenu de l'erreur (< 0,1 %) sur les mesures des densités-. L'incertitude sur la masse molaire, introduite par le terme $1 - \bar{v}$, serait alors de 2 %. Ceci nous semble tout à fait raisonnable, et confirme que la détermination de M peut être regardée avec confiance. c) Enfin, on peut calculer le volume partiel spécifique d'une protéine à partir de sa composition relative en acides aminés (37). Cette méthode donne en général des résultats qui sont en excellent accord avec l'expérience. Pour le cytochrome b_2, un tel calcul donne $\bar{v}$ = 0,741 cm^3/g alors que la valeur expérimentale utilisée est 0,744 cm^3/g.

En ce qui concerne la technique de diffraction des rayons X, on peut noter qu'il existe deux raisons principales pour lesquelles elle n'est pas utilisée plus souvent comme moyen de déterminer la masse molaire d'une protéine. La première, évidente, tient au fait que l'équipement nécessaire est rare alors que presque tous les gros laboratoires disposent d'ultracentrifugeuses. La seconde raison vient de ce que la plupart des cristaux de protéine sont obtenus à force ionique élevée. Or, il a été montré par Perutz (38) que la concentration saline à l'intérieur des cristaux peut être notablement inférieure à celle du solvant de cristallisation, la différence pouvant atteindre 30 %. Ainsi, lors du calcul de M à partir de la densité des cristaux, il faut faire une correction importante, mais inconnue. De ce fait, la méthode perd toute sa précision. Un tel problème ne se pose pas dans le cas du cytochrome b_2 puisque les 2 formes cristallines sont obtenues à très faible force ionique.

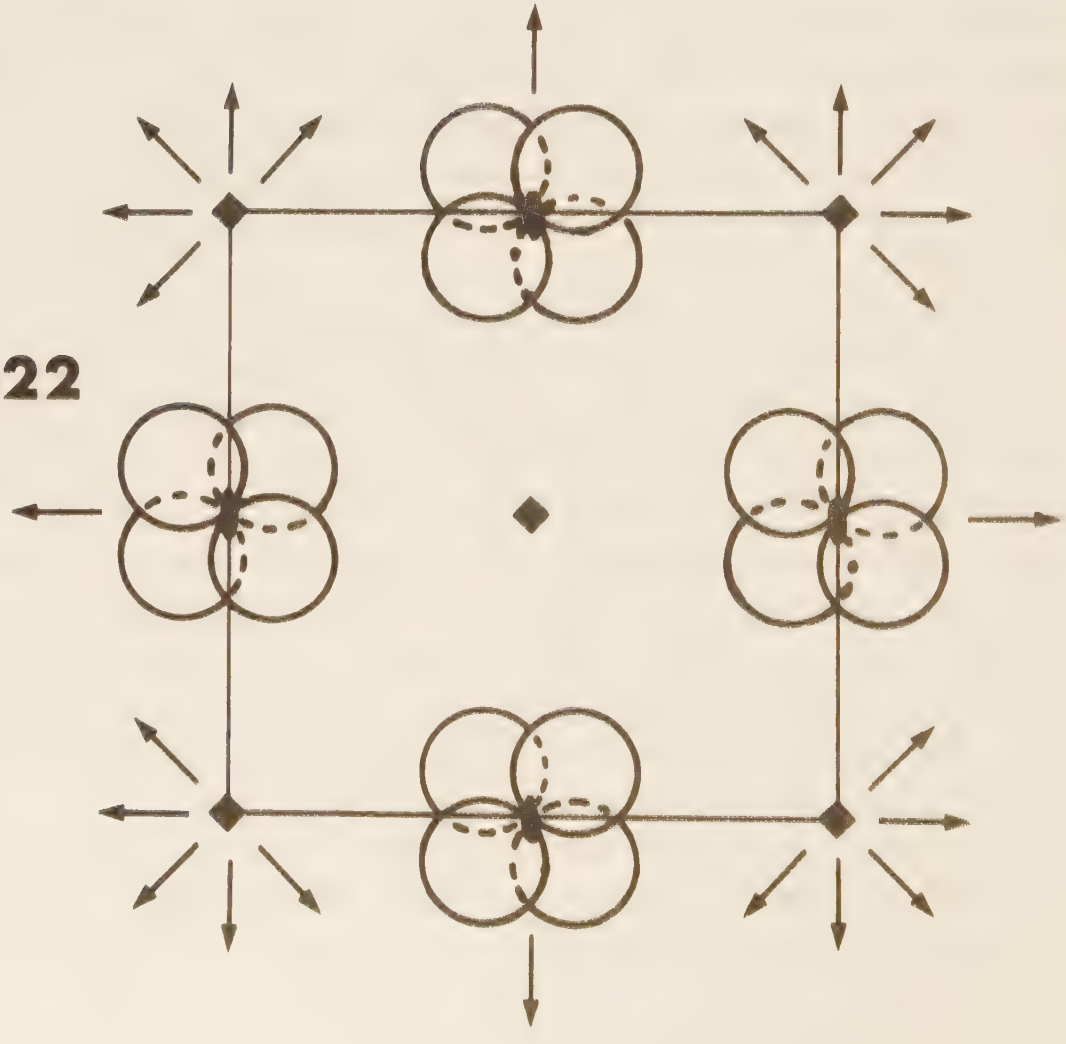
En conclusion, il ne semble pas que la masse moléculaire ainsi déterminée (235 000 ± 8 000) soit entachée d'une erreur systématique importante. Il faut noter qu'une étude récente par ultracentrifugation (39) a conduit à la valeur M = 240 000 ± 10 000. L'ensemble de ces deux déterminations donnerait donc M = 236 000 ± 6 000.

Des travaux parallèles menés au laboratoire ayant montré que la masse molaire par hème est de l'ordre de 58 000, il devient évident que le cytochrome b_2 est une molécule portant 4 hèmes et donc 4 FMN. Malheureusement, la diffraction des rayons X n'a pas permis de décider si la molécule était un dimère composé de deux moitiès identiques, ou un tétramère formé de quatre protomères identiques. Pour cela, il aurait fallu pouvoir lever l'ambiguité sur le groupe d'espace des cristaux tétragonaux, c'est à dire choisir entre la classe 4 (indiquant un dimère) ou la classe 422 (indiquant un tétramère). Nous savons en effet qu'il y a 2 molécules de cytochrome b_2

P4



P422



(235 000 daltons) par maille quadratique. On voit sur le schéma ci-contre que si la clase est 4 (groupe d'espace P4 par exemple) chaque molécule est nécéssairement située sur un site de symétrie 2 : le cytochrome b_2 peut être alors soit un vrai dimère (comme indiqué sur le schéma) soit un vrai tétramère qui acceptera évidemment un axe d'ordre 2. Au contraire, si la classe des cristaux est 422, il existe des axes d'ordre 2 supplémentaires (indiqués par des flèches sur le schéma), auquel cas la molécule est nécéssairement composée de 4 protomères identiques (à la résolution du diagramme de diffraction). Dans ce cas, la molécule tétramérique peut avoir la symétrie 4 ou la symétrie 222. C'est ce dernier cas qui est représenté sur le schéma. Un tel choix entre la classe 4 et la classe 422 n'est pas possible à partir de diagrammes de poudres, mais seulement en utilisant des clichés de diffraction de cristal unique. Malgré de nombreuses tentatives, il ne m'a pas été possible d'obtenir des cristaux tétragonaux d'une taille suffisante pour une telle étude. Je me suis donc tourné vers la microscopie électronique pour tenter de résoudre ce problème.

I - 3 ARTICLE II

THE CRYSTAL AND MOLECULAR STRUCTURE OF YEAST L-LACTATE DEHYDROGENASE (CYTOCHROME b_2) : AN ELECTRON MICROSCOPY STUDY BY NEGATIVE STAINING AND FREEZE-ETCHING TECHNIQUES.

J. Olive, J.N. Barbotin and J.L. Risler

(sous presse à Int. J. Peptide Prot. Res)

SUMMARY

An electron microscopy study of yeast cytochrome b_2 has been performed on two different crystalline forms by negative staining and freeze-etching.

The overall dimensions of the tetrameric molecule were deduced from the study of the trigonal (DNA-free) crystals, and were found to be 97 x 60 x 56 Å. These dimensions impose some restrictions to the possible packings of the molecules in the tetragonal (DNA-containing) crystals. Together with the optical diffraction pattern of the micrographs and results of earlier X-ray diffraction studies these data permit the conclusion that, at 20 Å resolution, cytochrome b_2 is a true tetramer with molecular symmetry 222.

INTRODUCTION

For a long time, baker's yeast cytochrome b_2 (L-lactate-cytochrome c oxidoreductase, EC 1.1.2.3.) was considered to be a dimer of molecular weight 180 000 (1, 2). The possibility of obtaining this protein in two different crystalline forms initiated a study of the crystals by electron microscopy (3) where the results were interpreted in terms of this proposed structure. In fact it was demonstrated later that cytochrome b_2 is actually a tetramer of molecular wight 235 000 (4, 5, 6). This new finding, along with the results concerning the unit cell parameters and protein content of the crystals as determined by X-ray diffraction (6), prompted us to reinvestigate the molecular and crystal organization of cytochrome b_2 by electron microscopy.

In the study of Burgoyne et al. (3) the dimensions of a cytochrome b_2 molecule were determined primarily from sections of crystals embedded in araldite after dehydration. In the present work we employed both the negative staining technique and freeze-etching for the direct observation of the crystals in the microscope. Using two mutually independent preparation techniques, we hoped to establish more accurate facts concerning the probable dimensions and symmetry of the tetrameric molecule and its mode of packing in the two crystal forms.

MATERIAL AND METHODS

Cytochrome b_2. Type I (DNA-containing) cytochrome b_2 was prepared from commercial bakers' yeast (Springer) according to Morton and Shepley (7) as modified by Spyridakis et al. (8) and crystallized by dialysis against 50 mM DL-lactate, 0.1 mM EDTA, pH 6.8. After removal of the DNA component (9) the resulting protein (type II) was obtained in its crystalline form by dialysis against the same buffer.

Electron microscopy. A Philips EM 300 microscope, operated at 80 kV, was used throughout this study.

In negative staining experiments, the crystals were stained with 2 % uranyl oxalate at pH 6.5.

Freeze-etching experiments were performed using a Balzers unit. The crystals were frozen without cryoprotective agents in Freon 22 and stored in liquid nitrogen. The cleavage was performed at -150°C, and the specimens were etched at -100°C for 90 sec.

The optical transforms of the micrographs were obtained using a Polaron instrument equipped with a helium-neon laser as a light source. The unit cell parameters of the crystals were measured from the diffraction patterns after calibration of the apparatus.

The signal-to-noise ratio of some micrographs was increased by photographic integration. The method consists in taking successive exposures of the micrographs, the printing paper under the enlarger being either translated between each exposure by an interval along a direction dictated by the periodicities on the micrographs (10), or rotated by an angle derived from the symmetry of the crystal (11).

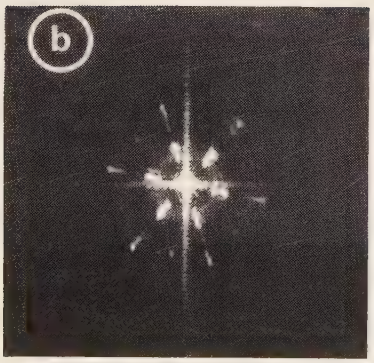
OBSERVATIONS

Trigonal crystals

The type II (DNA-free) crystals were established, by the previous X-ray powder diagrams study (6), as belonging to the trigonal system, space-group $P3_112$ or $P3_121$. The unit cell, made up of six tetrameric molecules (one per asymmetric unit), has parameters *a* = 168.2 Å and *c* = 112 Å.

The type II crystals are generally large, however crystals of smaller dimensions are always present, which allow a direct visualization by electron microscopy of the fine structure without sonication and sectioning. A micrograph obtained with negative staining representative of small crystals is shown in Fig.1a. Due to the thickness and the shape of the crystal, views along several directions are exhibited. When the crystal is viewed down the *c* axis, a hexagonal network of compact entities limiting large spaces occupied by staining material is visible, as it is shown in the upper part of Fig.1a. The sides of the hexagons in this region are 97 Å long and 60 Å large. The *a* parameter is 165 ± 5 Å, as measured from the diffraction pattern of this same area (Fig.1b).Neither in the original micrographs (Fig.1a) nor in the image obtained by rotatory integration (n = 60°, Fig.1c) any substructure of the compact entities could be demonstrated so far.

The results obtained with the freeze-etching technique are shown in Fig.2a. This micrograph again shows that the crystal lattice consists of a hexagonal network, suggesting that the fracture goes



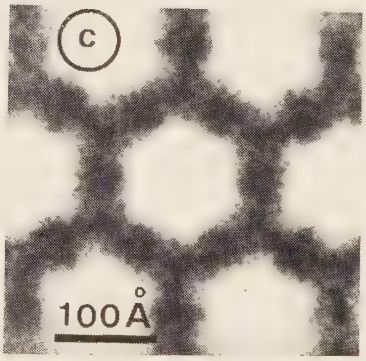


Figure 1

a : Negatively stained type II crystal (protein is white). Due to the thickness and the shape of the crystal, views along several directions are exhibited. In the central part, characterized by a hexagonal pattern, the crystal is viewed down the c axis.

b : Optical diffraction pattern obtained from the central part of figure 1a.

" : Integrated image obtained by rotation (60°) of the central hexagon of figure 1a (protein is black).

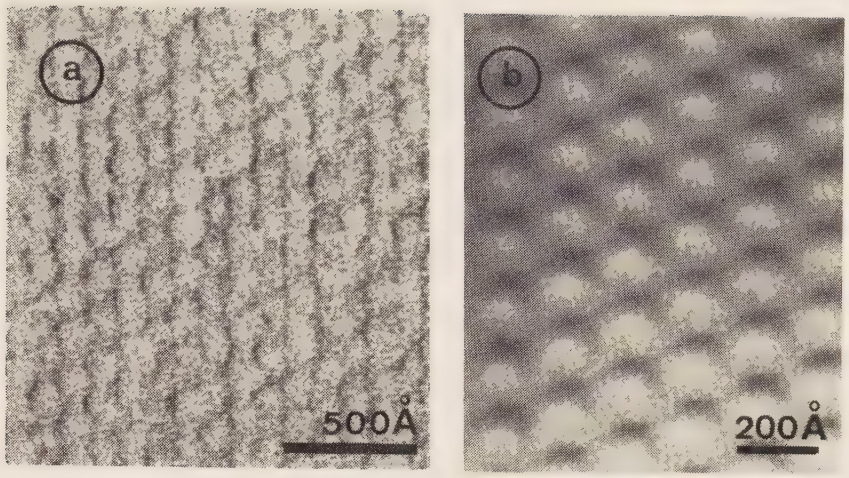


Figure 2

a : Image of a type II crystal obtained by freeze-etching. A hexagonal pattern is exhibited, suggesting that the fracture plane goes perpendicularly to the c axis.

b : Linear integration of figure 2a, from which the dimensions of the sides of the hexagons can be more accurately measured.

perpendicular to the c axis. The a parameter, estimated from the diffraction pattern, is 164 ± 5 Å. In Fig.2b is shown the result obtained after linear integration of Fig.2a. In agreement with the results given by negative staining, the length and width of the hexagon sides, as revealed by freeze-etching (Fig.2b), are 95 ± 6 Å and 60 ± 5 Å, respectively.

Further informations concerning the hexagonal lattice can now be derived by the analysis of views parallel to the c axis. The results of both negative staining (Fig.3a) and freeze-etching (Fig.3b) indicate that the entities forming the hexagonal lattice are stacked along continuous rows parallel to the 3_1 axis. The contact between the proteins is so close that the c parameter cannot be appreciated from the micrographs obtained with negatively stained preparations (Fig.3a). The formation of this pattern is not readily apparent and it will be discussed later. However, some regular organization along the c axis can be observed in the micrograph of the freeze-etched material (Fig.3b). This is better illustrated at higher magnification (Fig.4a) and indeed the diffraction pattern of the micrograph (Fig. 4b) definitely indicates a repetitive arrangement of the protein along the c axis. The parameters corresponding to the optical transform are 161 ± 9 Å and 108 ± 6 Å, which respectively correspond to the a (168 Å) and c (112 Å) parameters of the crystal. Thus freeze-etching, which enables the c parameter to be measured, gives additional information not attainable by negative staining.

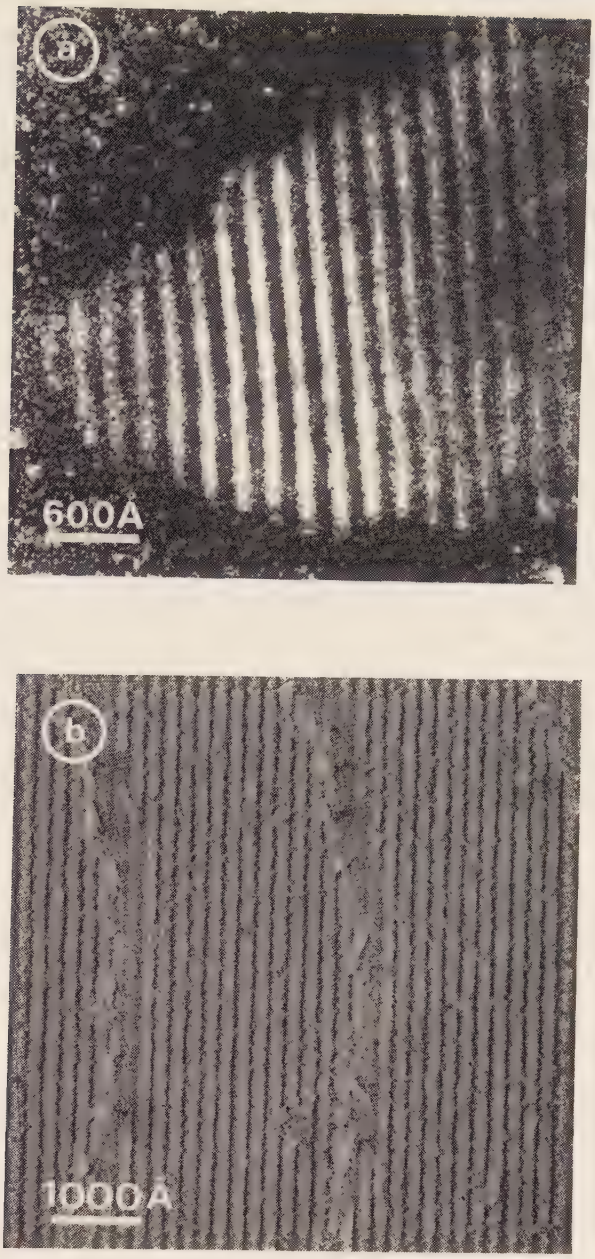


Figure 3

a : A negatively stained type II crystal observed perpendicularly to the c axis

b : Same view as in figure 3a obtained on a freeze-etched crystal.
Both micrographs indicate that the entities forming the hexagonal lattice are stacked along continuous rows parallel to the c axis.

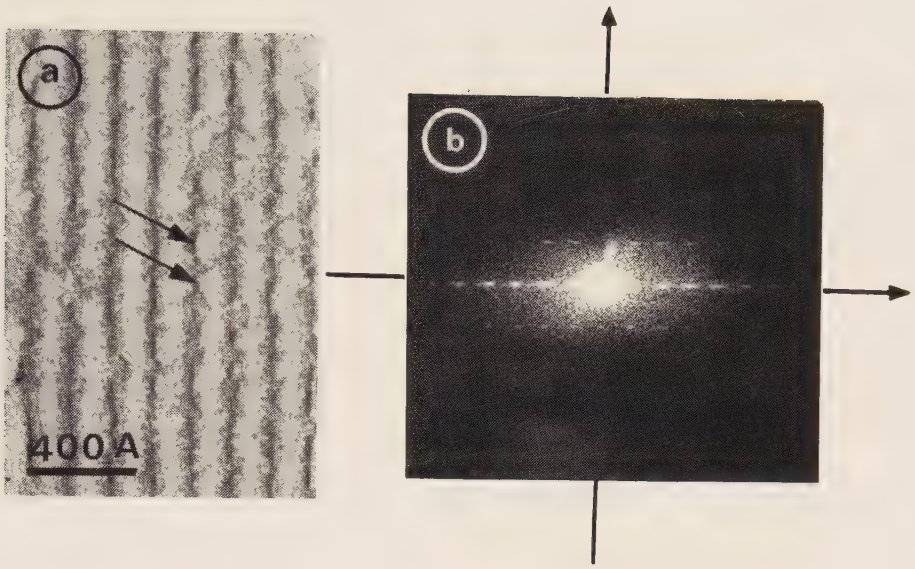


Figure 4

a : Enlargement of figure 3b showing the repetitive arrangement of the protein along the c axis (arrows).

b : Optical diffraction pattern of figure 3b from which the repetitive distance between the protein entities along the rows can be measured.

Tetragonal crystals

The type I (DNA-containing) crystals have been shown by X-ray diffraction (6) to belong to the tetragonal system with unit cell parameters a = 99 Å, c = 87 Å and two molecules per unit cell. The space-group could not be established unambiguously.

The crystals consist of very thin, square plates which, once they are spread on the microscope grid, fell flat. Thus planes perpendicular to the c axis are almost exclusively visualized. A typical electron micrograph obtained with a negatively stained crystal is shown in Fig.5a, together with the image obtained by linear integration. The fourfold symmetry , due to the fact that the crystal viewed down the c axis, is clearly shown. The square net seems to be composed of four units placed at the corners of a square. The optical diffraction pattern (Fig.5b) gives for the a parameter a value of 95 ± 5 Å, and exhibits a 4 mm symmetry as indicated by the intensities of the spots. For this optical transform, the outer reflexions correspond to spacings of 20 Å. The comparable pattern is obtained on the replica of freeze-etched crystals when the cleavage likely passes in a plane perpendicular to the c axis (Fig.6a). On this micrograph the a parameter has a value of 94 ± 6 Å (Fig.6b).

In contrast to the fact that no other projections than those corresponding to the a, b plane are visualized in negative staining, freeze-etched crystals may exhibit fracture faces either corresponding to the a, b plane (Fig.6a) or to other planes in any direction oblique to the crystallographic axes. The latter possibility is probably illustrated by Fig.6c, in which the appearance of the fracture face is

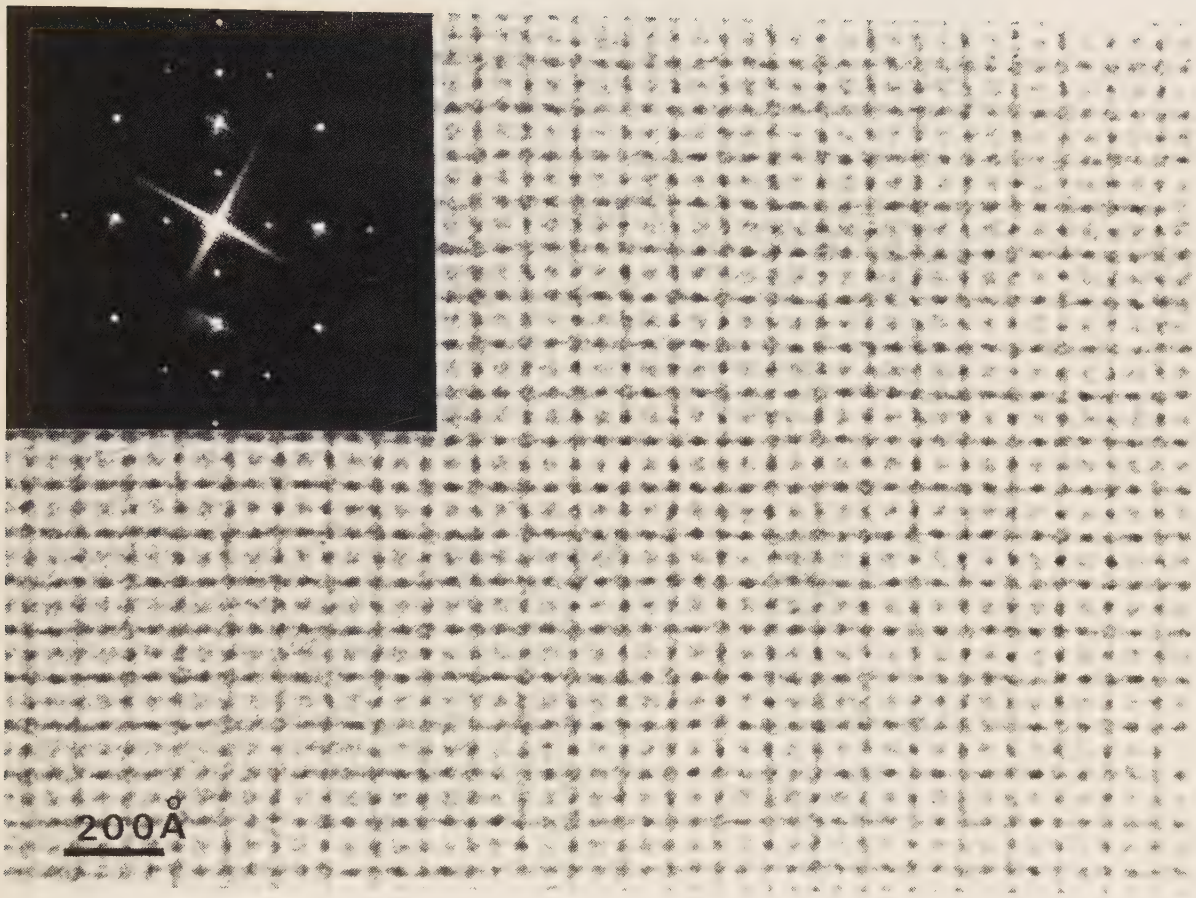


Figure 5

A negatively stained type I crystal viewed along the c axis (protein is white). The fourfold symmetry of the crystal is clearly shown.
Insert : optical diffraction pattern of figure 5a.

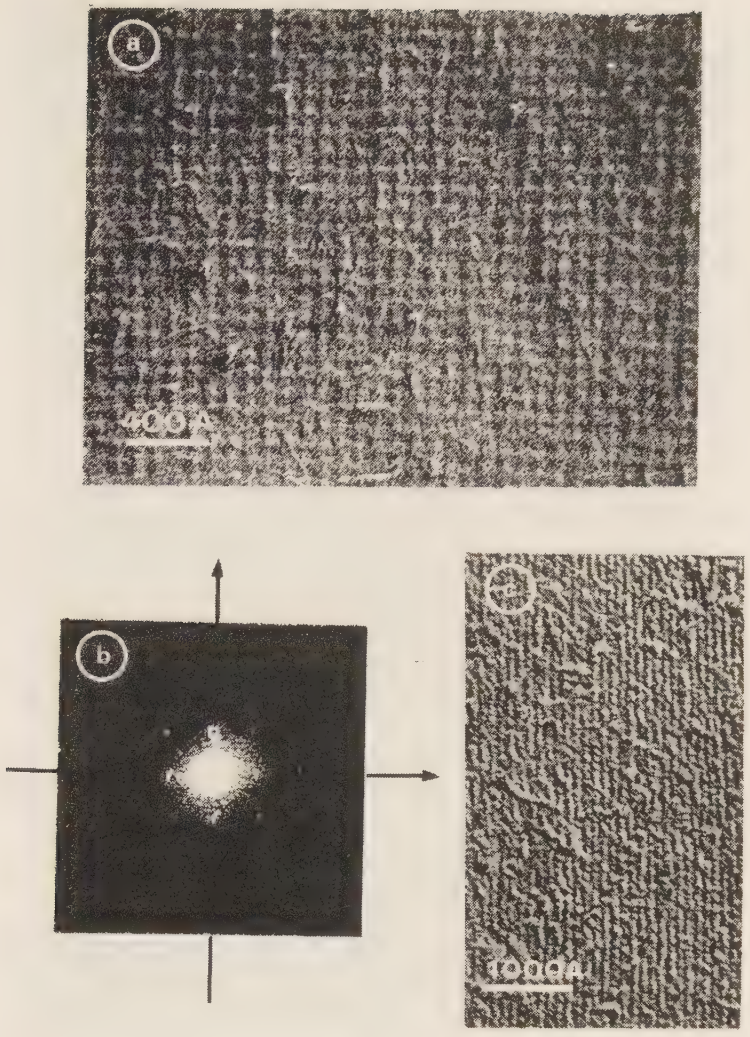


Figure 6

a : Image of a type I crystal obtained by freeze-etching. This tetragonal pattern suggests that the fracture plane runs perpendicularly to the c axis.

b : Optical diffraction pattern of figure 6a.

c : Another image of a freeze-etched type I crystal, probably corresponding to a fracture plane oblique to the crystallographic axes.

quite different from that of Fig.6a. In this micrograph, the distance between the parallel rows is measured to be 102 ± 7 Å, and that between the protein entities along these rows is 95 ± 7 Å. It should be mentioned that the difference between the values of the a and c parameters (respectively 99 and 87 Å) is probably too small to enable the unambiguous identification in freeze-etched material of the a,c plane.

DISCUSSION

The results on negatively stained preparations of type I and type II crystals are comparable to those presented in 1967 by Burgoyne et al. (3). However these authors have derived the dimensions of the hexagon sides, which were supposed to consist of one dimeric molecule, only from thin sections of type II crystals embedded in araldite and positively stained. The length of one side thus determined (82 Å) is not inconsistent with the dimension indicated in the present paper (97 Å), which had also been derived from the X-ray data. On the other hand, the width of the hexagon sides as determined by Burgoyne et al. (3) from the embedded crystals is twice as small as that measured by us on negatively stained and freeze-etched crystals. Furthermore, since the molecular weight of the cytochrome b_2 molecule has been recently reestablished, as well as the quaternary structure and the number of molecules per unit cell (6), previous results on the structure of the crystals have to be revised.

As far as the trigonal system is concerned, the following arguments strengthen the view that our present results enable to outline the actual structure of the type II crystals.

i) the a parameter of 165 ± 5 Å measured here corresponds closely to the value of 168.2 Å obtained by X-ray diffraction ;

ii) negative staining and freeze-etching, two very different methods, give complementary results ;

iii) from the image shown in Fig.1a, the water is calculated to occupy 37 % of the total area of a section perpendicular to the c axis. This is exactly the volume occupied by water in the crystals, as deduced from X-ray data (6). From these results it is conceivable that no appreciable spaces between the molecules in directions parallel to the c axis exist, as is also indicated in Fig.3a and b. Thus the extreme porosity of the crystals is due to the existence of large water cylinders (Fig.5a and b). This might be a possible explanation of the diffusion of cytochrome c molecules into the crystals without modifying the unit cell parameters (12).

The three dimensions of the hexagon sides (Fig.1a) are obtained from both the electron microscopy and X-ray data. These two techniques enable the measurement of their length (97 Å) and height (i.e. the c parameter, 112 Å) whereas their width (60 Å) can be obtained only from the electron micrographs. Since there are six molecules per unit cell, each hexagon side must be composed of two tetrameric cytochrome b_2 molecules. Hence these two molecules are enclosed in a "box" of dimensions 112 x 97 x 60 Å, corresponding to a volume of 650 000 $Å^3$. Indeed, the independently

calculated volume of one tetramer (molecular weight 235 000, partial specific volume $\bar{v}$ = 0.74 cm^3/g) is 288 000 $Å^3$, thus two molecules can be accommodated in this "box". It is very unlikely that the two molecules are arranged side by side along the c axis since in this case the largest dimension of one tetramer would be 112 Å, which is not compatible with the parameters of the tetragonal unit cell (a = 99 Å, c = 87 Å). Therefore it is most probable that the two molecules are stacked along the c axis, which means that one dimension of a molecule is half the length of c, giving the overall size of a tetramer as 97 x 60 x 56 Å. This suggests that the cytochrome b_2 molecule has an ellipsoidal shape.

With all the information now at hand, a tentative model of the crystal packing can be constructed (Fig. 7). Noteworthy is the helicoidal distribution of the molecules, imposed by the threefold screw-axes, and the fact that this model simulates the general appearance of the micrographs. Looking down the c axis (Fig.7a), one obtains the image of a honeycomb as in Fig.1 and 2. Looking perpendicularly to the c axis (Fig.7b), the molecules are so densely packed that the c parameter can hardly be appreciated (see also Fig.3).

As far as the tetragonal (DNA-containing) crystals are concerned, we would stress the concordance between results on the negatively stained preparations and the freeze-etched crystals. Moreover the value of the a parameter as found in the present study (94-95 Å) is very close to that derived by X-ray diffraction analysis (99 Å).

Although the X-ray study showed that the crystals belonged to the tetragonal system (6), the method used (powder diagrams) did

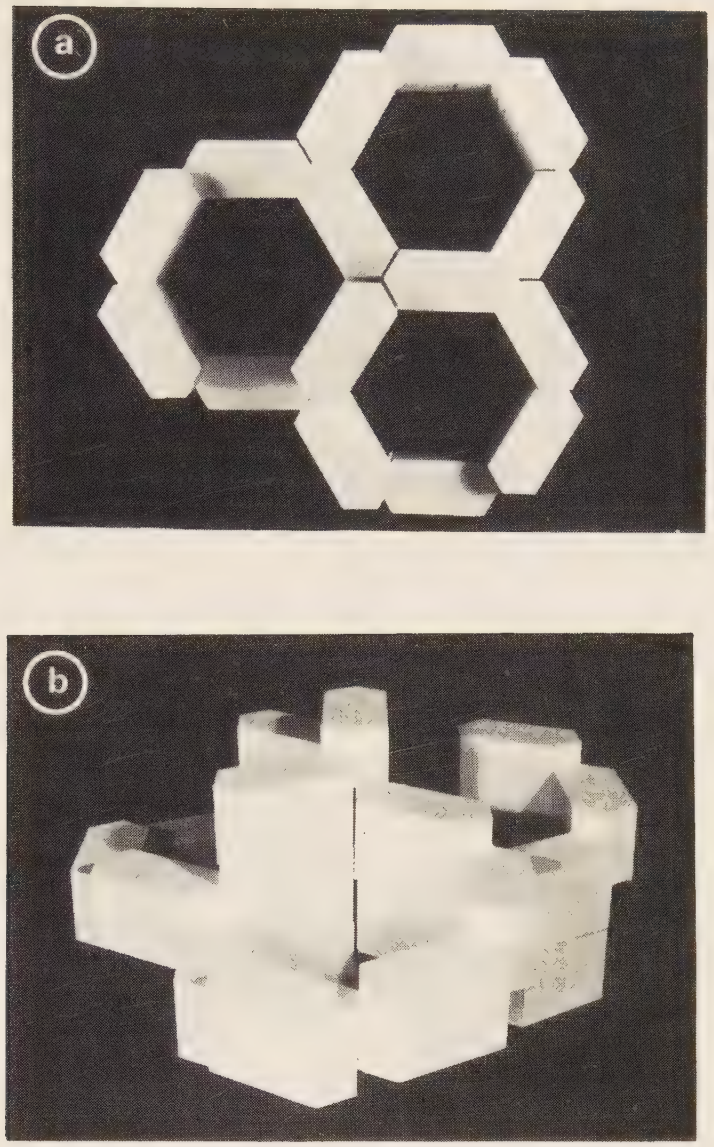


Figure 7

Models of type II cytochrome b_2 crystals showing the hexagonal pattern when viewed down the c axis (a) and the close packing of the molecules along the threefold screw axis (b).

Each wooden block represents one cytochrome b_2 tetramer. The geometrical shape was chosen only to facilitate model building, and pretends in no way to reflect the actual structure of the molecule.

not enable us to make a choice between class 4 and class 422. This ambiguity can now be raised since the diffraction pattern of negatively stained type I crystals (Fig. 5b) possesses 4 mm symmetry. This indicates that the class is actually 422, at least at the resolution of 20 Å obtained in the present study. The possible space-groups are thus limited to P422 and $P4_222$. Since there are only two molecules per unit cell, one immediate conclusion is that the cytochrome b_2 molecule is a true tetramer composed of four identical protomers. Of course, small differences between the protomers would not appear at 20 Å resolution, but this indicates that there are no gross differences between them.

The comparison between the overall dimensions of one tetramer (97 x 60 x 56 Å, as obtained from the type II crystals) and the unit cell parameters of the type I crystals ($\underline{a}$ = 99 Å, $\underline{c}$ = 87 Å) show that the two molecules in the tetragonal unit cell cannot be stacked one above the other along the $\underline{c}$ axis. This eliminates the possibility that the two molecules of cytochrome b_2 could lie at positions 1/2, 1/2, z ; 1/2, 1/2, $\bar{z}$ or 0,0,z ; 0,0,$\bar{z}$ in space-group P422 (13). It follows that the cytochrome b_2 molecule does not possess the molecular symmetry 4, where the four protomers composing one tetrameric molecule would be disposed in the same plane at the corners of a square. On the other hand, the other possible positions where the molecules are not superimposed along $\underline{c}$ in the tetragonal crystals, either in space-groups P422 or $P4_222$, all indicate that the molecular symmetry must be 222 (13). This means that the four protomers in one molecule are related to one another by three mutually perpendicular dyad axes. It should be mentioned that such a 222 (or pseudo-222)

symmetry has already been described in a number of tetramers such as hemoglobin (14), aldolase (15), muscle lactate dehydrogenase (16), human glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (17), L-asparaginase (18), phosphoglycerate mutase (19), prealbumin (20) and concanavalin A (21, 22). On the contrary, a tetramer possessing molecular symmetry 4 has never been described unambiguously.

As already pointed out, some substructure seems to be visible in the micrographs of type I crystals (Fig.5a) where the repeating unit appears as a square "tetramer" composed of four, adjacent spherical "protomers". However, one must recall that this picture of non-sectioned material likely reflects a projection of several unit cells along the c axis, this appearance being the result of the overlapping of repeating entities according to the crystal symmetry. In these circumstances the structure of individual protomers is not easily understood.

According to Appleby and Morton (23) the tetragonal crystals contain about 5 % DNA. The methods we have applied do not enable the visualization of the nucleic acid component, so that no information concerning the DNA present in the crystals can be obtained. On the other hand, the role of this component in the organization of the crystals has not yet been clarified.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Dr. E. L. BENEDETTI, in whose laboratory this work was carried out, for his constant help during the course of this study. Thanks are also due to Dr. F. Labeyrie for her interest and encouragement, and to Drs. V. Luzzati and C. Monteilhet for their constructive criticisms. This work constitues a part of a Doctoral Thesis (Doctorat ès Sciences) to be submitted by one of us (JLR) to the Faculté des Sciences d'Orsay.

REFERENCES

1. APPLEBY, C.A., and MORTON, R.K., Biochem. J., 73, 539-550 (1959).
2. ARMSTRONG, J. Mc D., COATES, J.H., and MORTON, R.K., Biochem. J., 86, 136-145 (1963).
3. BURGOYNE, L.A., DYER, P.Y., and SYMONS, R.H., J. Ultrastruct. Res., 20, 20-32 (1967).
4. JACQ, C., and LEDERER, F., Eur. J. Biochem., 12, 154-157 (1970).
5. PAJOT, P., and GROUDINSKY, O., Eur. J. Biochem., 12, 158-164 (1970).
6. MONTEILHET, C., and RISLER, J.L., Eur. J. Biochem., 12, 165-169 (1970).
7. MORTON, R.K., and SHEPLEY, K., Biochem. J., 89, 257-262 (1963).
8. SPYRIDAKIS, A., NASLIN, L., and LABEYRIE, F., Biochimie, 53, 195-205 (1971).
9. SYMONS, R.H., Biochim. Biophys. Acta, 103, 298-310 (1965).
10. MARKHAM, R., HITCHBORN, J.H., HILLS, G.J., and FREY, S., Virology, 22, 342-359 (1964).
11. MARKHAM, R., FREY, S., and HILLS, G.J., Virology, 20, 88-106 (1963).
12. BAUDRAS, A., LABEYRIE, F., RISLER, J.L., and MONTEILHET, C., unpublished results.
13. International Tables for X-ray Crystallography, Vol. 1, Kynoch Press, Birmingham, 1952, p.179.
14. PERUTZ, M.F., MUIRHEAD, H., COX, J.M., GOAMAN, L.C.C., MATHEWS, F.S., Mc GANDY, E. L., and WEBB, L.E., Nature, 219, 29-32 (1968).
15. EAGLES, P.A.M., JOHNSON, L.N., JOYNSON, M.H., McMURRAY, C.H., and GUTFREUND, H., J. Mol. Biol., 45, 533-544 (1969).

16. ADAMS, M.J., FORD, G.C., KOEKOEK, R., LENTZ, P.J., Mc PHERSON, A., ROSSMANN, M.G., SMILEY, I.E., SCHEVITZ, R.W., and WONACOTT, A.J., Nature, 227, 1098-1103.(1970).

17. GORYUNOV, A.I., and ANDREEVA, N.S., Mol. Biol. (English Ed.), 1, 261-265 (1967).

18. EPP, O., STEIGEMANN, W., FORMANEK, H.,and HUBER, R., Eur. J. Biochem., 20, 432-437 (1971).

19. CAMPBELL, J.W., HODGSON, G.I., WATSON, H.C., and SCOPES, R.K., J. Mol. Biol., 61, 257-259 (1971).

20. BLAKE, C.C.F., SWAN, I.A.D., RERAT, C., BERTHOU, J., LAURENT, A., and RERAT, B., J. Mol. Biol., 61, 217-224 (1971).

21. QUIOCHO, F.A., REEKE, G.N., BECKER, J.W., LIPSCOMB, W.N., and EDELMAN, G.M., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 68, 1853-1857 (1971).

22. HARDMAN, K.D., WOOD, M.K., SCHIFFER, M., EDMUNDSON, A.B., and AINSWORTH, C.F., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 68, 1393-1397 (1971).

23. APPLEBY, C.A., and MORTON, R.K., Biochem. J., 75, 258-269 (1960).

C H A P I T R E I I

ETUDE DES RELATIONS SPATIALES ENTRE L'HEME ET LA FLAVINE

II - 1 INTRODUCTION

Nous venons d'examiner la masse, les dimensions, la forme et la symétrie d'une molécule de cytochrome b_2. Entrons maintenant un peu plus dans l'intimité de cette molécule, et cherchons à déterminer quelles relations spatiales existent entre l'hème et la flavine.

Comme nous le verrons plus en détail dans les articles suivants, on a pensé pendant quelque temps que les deux groupes prosthétiques étaient éloignés l'un de l'autre :

a) Les études spectrofluorométriques de Iwatsubo et di Franco (40) montraient que la fluorescence protéique (due aux tryptophanes) était éteinte par la flavine, mais pas par l'hème. On pouvait donc penser que les tryptophanes étaient proches du FMN et loin de l'hème, les deux groupes prosthétiques étant dans ce cas relativement distants l'un de l'autre. Une autre interprétation possible faisait intervenir l'orientation relative des divers chromophores (tryptophanes, hème et FMN) et non pas leurs distances relatives. En fait, c'est cette dernière explication qui semble être la bonne à la lumière des expériences de phosphorescence qui sont décrites plus loin.

b) En supposant que le mécanisme réactionnel du cytochrome b_2 ne faisait pas intervenir de flavine semiquinone, on a pu calculer une vitesse apparente de transfert des électrons de la flavine à l'hème (41). Cette vitesse apparente étant lente (100 - 200 sec^{-1}), on était tenté de conclure que les groupes prosthétiques n'étaient pas proches l'un de l'autre. En fait, des expériences récentes de résonance paramagnétique électronique (C. Blandin-Capeillère et R.C. Bray) montrent qu'un radical semiquinonique apparait lors de la réduction des groupes prosthétiques par le lactate, ce qui infirme la validité du calcul précédent. Par ailleurs, la réduction de l'hème semble être concomitante avec la réoxydation de la flavine à l'état de semiquinone : ceci suggère que le transfert FMN $\longrightarrow$ hème est rapide. C'est donc pour tenter de résoudre ce problème de la distance relative entre les groupes prosthétiques que j'ai employé les méthodes de dichroisme circulaire, naturel et magnétique. Comme nous le verrons, les résultats obtenus suggèrent que l'hème et la flavine seraient très proches l'un de l'autre.

II - 2 ARTICLE III

FLUORESCENCE ET PHOSPHORESCENCE DU CYTOCHROME b_2 ; ORIENTATION RELATIVE DE L'HEME ET DE LA FLAVINE PROSTHETIQUES.

[Reprinted from Biochemistry, (1971) 10, 2664.]
Copyright 1971 by the American Chemical Society and reprinted by permission of the copyright owner.

Fluorescence and Phosphorescence of Yeast L-Lactate Dehydrogenase (Cytochrome b_2). Relative Orientations of the Prosthetic Heme and Flavin*

Jean-Loup Risler

ABSTRACT: The phosphorescence of yeast L-lactate dehydrogenase (cytochrome b_2) has been studied and compared to its fluorescence. It was already demonstrated that the tryptophan fluorescence is quenched only by flavin mononucleotide (FMN), not by heme. This study, on the contrary, showed that the protein phosphorescence is quenched only by the heme groups, not by FMN. This effect suggests the occurrence of a triplet–singlet energy transfer from tryptophans to heme. The critical transfer distances Trp → heme in reduced cytochrome b_2 were calculated to be 38 and 34 Å, respectively, for fluorescence and phosphorescence, whereas the molecular diameter of one protomer is about 40 Å. Thus, the reciprocal behavior of the tryptophan fluorescence and phosphorescence toward quenching by heme and FMN cannot be explained by too great a distance between chromophores and is best interpreted as being due to the perpendicularity of the emission oscillators of tryptophan. It is thus concluded that the FMN and heme planes must be roughly orthogonal.

Bakers' yeast cytochrome b_2 (L-lactate:cytochrome *c* oxidoreductase, EC 1.1.2.3) is now known to be a tetrameric enzyme of molecular weight 235,000 bearing four hemes and four FMN prosthetic groups (Jacq and Lederer, 1970; Pajot and Groudinsky, 1970; Monteilhet and Risler, 1970). Unlike other hemoproteins such as hemoglobin, myoglobin (Truong *et al.*, 1967), peroxidase, and catalase (Weber and Teale, 1959), the deflavocytochrome b_2 (still possessing four hemes) exhibits a marked protein fluorescence (Iwatsubo and di Franco, 1968). In particular, it was shown by these last authors that, among the five tryptophans per protomer of 58,000, the fluorescence of one tryptophan was completely quenched, whereas that of the other four was not affected by the heme group. To explain this somewhat uncommon fact, two alternative explanations, based on Förster's (1959) theory of energy transfer, were considered (Labeyrie *et al.*, 1967). That is to say, either the tryptophans are far from the heme and close to the FMN, the two prosthetic groups being thus relatively far apart, or the fluorescence oscillators of tryptophans are parallel to the absorption oscillator of FMN and perpendicular to that of the heme.

The question is therefore raised as to whether the luminescence properties of cytochrome b_2 are determined by the distances between chromophores or by their mutual orientation. To solve this problem, we undertook a phosphorescence study of cytochrome b_2 and its derivatives, since it is known (Konev, 1967) that the phosphorescence oscillator of tryptophan is perpendicular to the indole plane, whereas the fluorescence oscillator lies in this plane. Therefore, if the orientation factor is of predominant importance the fluorescence and phosphorescence properties should be complementary. In fact, this complementary effect seems to be verified as will be shown.

Material and Methods

Type-II (DNA-free) cytochrome b_2 was obtained according to Symons (1965) from type-I crystals prepared following the method of Appleby and Morton (1954) as modified by Spyridakis *et al.* (1971). The solution was then desalted and oxidized by passing through a small column of Sephadex G-25 equilibrated in 0.1 M phosphate–1 mM EDTA (pH 7.0) and reduced, when necessary, by addition of a small amount of DL-lactate. The concentration, expressed in heme content, was estimated from the absorptivity of the reduced γ band (ϵ_{424} 183 mM^{-1} cm^{-1}) (Pajot and Groudinsky, 1970).

Deflavocytochrome b_2. The derivative without FMN—which still binds the hemes—was prepared by acid–sulfate treatment according to Baudras (1965). Recovery of 60% of the initial enzymic activity was usually obtained after FMN addition. For the reduced γ band, ϵ_{424} 181 mM^{-1} cm^{-1} was used.

Apocytochrome b_2. An apoprotein containing neither heme nor FMN, but which reversibly binds protoheme, was prepared according to Mével-Ninio *et al.* (1971) in the following way. A fresh enzyme solution was precipitated in 60% saturated ammonium sulfate (pH 7.0). The precipitate was dissolved in 6 M guanidine hydrochloride–0.1 M phosphate (pH 7.2) to a final concentration of 30–40 μM. The solution was allowed to stand for 1 hr at 0°, and then passed through a Sephadex G-25 column (1 × 15 cm) equilibrated in the same buffer, in order to remove the dissociated heme and flavin. The eluate was dialyzed at 4° for 60 hr against 50 mM DL-lactate, 20 μM EDTA, 0.1 M β-mercaptoethanol, and 0.2 M phosphate (pH 7.2), and then passed through a Sephadex G-25 column (1 × 20 cm) equilibrated in 0.2 M phosphate–20 μM EDTA (pH 7.2) to remove lactate and mercaptoethanol. The protein concentration was then estimated according to F. Labeyrie *et al.* (1970, personal communication) by comparing its tryptophan fluorescence in 6 M guanidine hydrochloride (excitation 295 nm) with that of free tryptophan added to this same solution, and assuming five tryptophans per heme, *i.e.*, per 58,000 g of protein.

Protoporphyrin IX was prepared from the dimethyl ester (Sigma) by hydrolysis in 5 N HCl (Grinstein, 1947). The extinc-

* From the Centre de Génétique Moléculaire du Centre National de la Recherche Scientifique, 91-Gif-sur-Yvette, France. *Received November 13, 1970.* This work has been supported in part by a grant from the Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique. This work constitutes a portion of a thesis to be submitted to the Université de Paris, Faculté des Sciences d'Orsay, for completion of a Doctorat ès Sciences.

tion coefficient in 2.7 N HCl is $\epsilon_{108} = 262$ mM^{-1} cm^{-1} (Falk, 1964a).

Fluorescence and Phosphorescence. The protein emission was studied on a spectrofluorometer built in the laboratory (Iwatsubo and di Franco, 1965) and slightly modified for phosphorescence studies with a rotating shutter. The light source was a 450-W xenon arc, and emission was recorded through a selected EMI photomultiplier (9558 QA). The gratings used (Bausch & Lomb) were blazed at 300 and 500 nm, for fluorescence and phosphorescence measurements, respectively. The excitation and emission bandwidths were adjusted to 5 nm for all spectra with excitation wavelength set at 295 nm, so that only the tryptophans were excited. Phosphorescence lifetimes were obtained by rapidly shutting the excitation slit and recording the phosphorescence decrease on a rapid-scanning recorder, or directly by observing on a storage oscilloscope screen the phosphorescence transmitted through the rotating shutter. Plots of $\ln I = f(t)$ gave straight lines of slopes equal to $1/\tau$. The luminescence spectra were obtained at 77°K, either by dissolving the sample in 0.1 M Tris-HCl (pH 7.0) containing 0.5% sucrose by weight—which gives a poor glass—or in a concentrated sucrose solution (14 g of sucrose in 10 ml of Tris buffer) which gives a perfectly transparent glass with practically no background emission. Both techniques gave the same quantitative results.

Because of the very strong fluorescence of the quartz capillaries and Dewar flasks, we could not measure simultaneously the protein fluorescence and phosphorescence. We therefore adopted the following procedure: the protein fluorescence was measured at room temperature (22°) and compared to the fluorescence of tryptophan; then, the protein phosphorescence was recorded at 77°K and also compared to the phosphorescence of tryptophan under the same conditions (excitation was always at 295 nm). *P* and *F* being, respectively, the integrated phosphorescence and fluorescence emissions, the ratio *P*/*F* was arbitrarily set at 1.0 for free tryptophan and the relative *P*/*F* ratio of the protein was subsequently calculated. Since the quantum yields of the tryptophan fluorescence and phosphorescence vary with temperature, we preferred to employ *P*/*F* ratios rather than quantum yields; the conditions of the protein fluorescence measurements, on the one hand, and those of the protein phosphorescence, on the other hand, being precisely defined, the relative *P*/*F* ratios are a reproducible and sensitive way of comparing the native protein and its derivatives. Moreover, the use of *P*/*F* is also useful when one deals with phosphorescence quenching.

Results

We have limited ourselves to the influence of the two prosthetic groups on the tryptophan fluorescence and phosphorescence by choosing an excitation wavelength of the protein luminescence such that only the tryptophan and *not* the tyrosine absorbs, *i.e.*, by exciting at 295 nm.

Tryptophan. In order to verify the performance of our apparatus, we first studied the phosphorescence of free tryptophan; the features of the spectra obtained (Figure 1) are in agreement with those already published (Truong *et al.*, 1967; Konev, 1967). The phosphorescence lifetime was found to be 6.3 ± 0.3 sec, a value which is consistent with those reported by others (Weinryb and Steiner, 1968; Steiner and Kolinsky, 1968).

Holocytochrome b_2. The fluorescence of the holocytochrome b_2 is 70% quenched by FMN (Iwatsubo and di Franco, 1968) while the phosphorescence of the native protein is weak

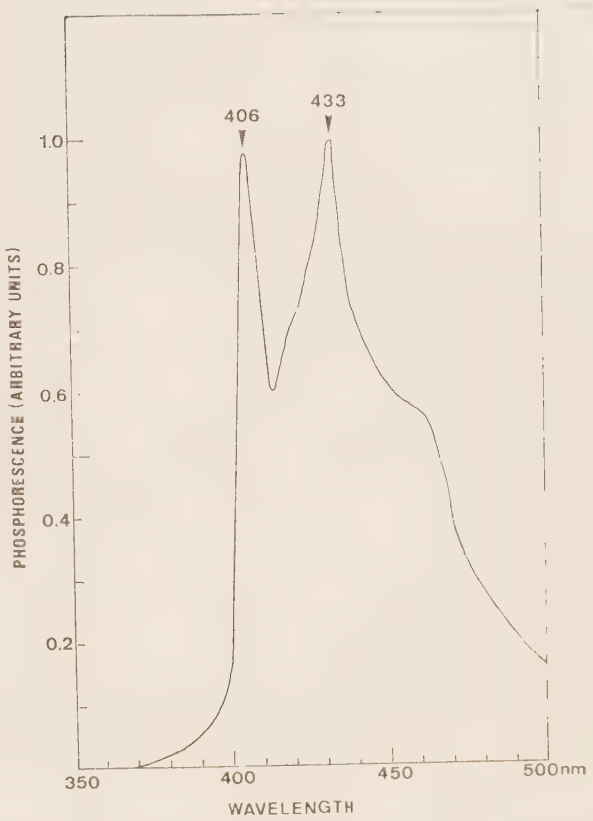


FIGURE 1: Phosphorescence spectrum at 77°K of tryptophan. Tryptophan was first dissolved in 0.1 M Tris-HCl-1 mM EDTA (pH 7.0) containing 0.5% sucrose by weight, and then brought to liquid nitrogen temperature. Excitation 295 nm. The spectrum is not corrected for photomultiplier response and grating transmission.

(Figure 2, curve b). The relative *P*/*F* ratio was found to be 0.4 (*P*/*F* arbitrarily set at 1.0 for free tryptophan) and the phosphorescence lifetime was 3.8 ± 0.3 sec, when in either the oxidized or reduced state. The 406-nm phosphorescence band is relatively lower in hemoproteins because of reabsorption of the emitted light by the strong heme Soret band. Corrections were calculated to account for this effect. At the protein concentration employed (3–5 μM) and a capillary radius of 1 mm, of the measuring cuvet, the corrections on the integrated phosphorescence spectra were of the order of 5–10%.

Deflavocytochrome b_2. The tryptophan phosphorescence of the FMN-free enzyme, which still binds the hemes, was about three times greater than in the holocytochrome b_2 (Figure 2, curve a), but the *P*/*F* ratio and the phosphorescence lifetime remained, respectively, 0.4 and 3.8 sec, regardless of the oxidation state of the heme. In Figure 2 (insertion) is also presented an oscilloscopic tracing of the decrease in phosphorescence of the deflavoenzyme, together with a plot of $\ln I = f(t)$. It can be seen that this plot is linear in the time scale used, thus a single lifetime is assumed. Since there are four emitting tryptophans per heme (Iwatsubo and di Franco, 1968), this suggests that these tryptophans are affected roughly in the same way.

Apocytochrome b_2. The fluorescence spectrum of the apoprotein showed a shift of the maximum from 355 nm in 6 M guanidine hydrochloride (pH 7.2) to 325 nm in 0.2 M phosphate (pH 7.2). Mention should be made that ultracentrifuge sedimentation determinations (Mével-Ninio *et al.*, 1971) performed on the same apocytochrome in 0.15 M phosphate (pH 7.2) gave a value of $s_{20,w}$ of about 7 S, a value quite comparable

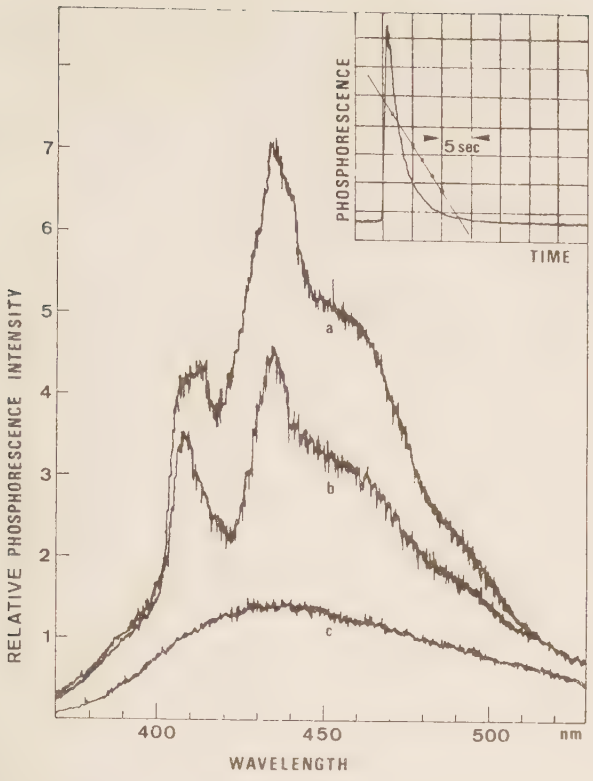


FIGURE 2: Phosphorescence spectra of (a) 3.8 μM deflavocytochrome b_2, (b) 5.5 μM holocytochrome b_2, and (c) solvent emission. Excitation 295 nm. Insertion: phosphorescence lifetime of the deflavocytochrome b_2, obtained by oscilloscopic recording of the light transmitted through the rotating shutter. Same conditions as in Figure 1.

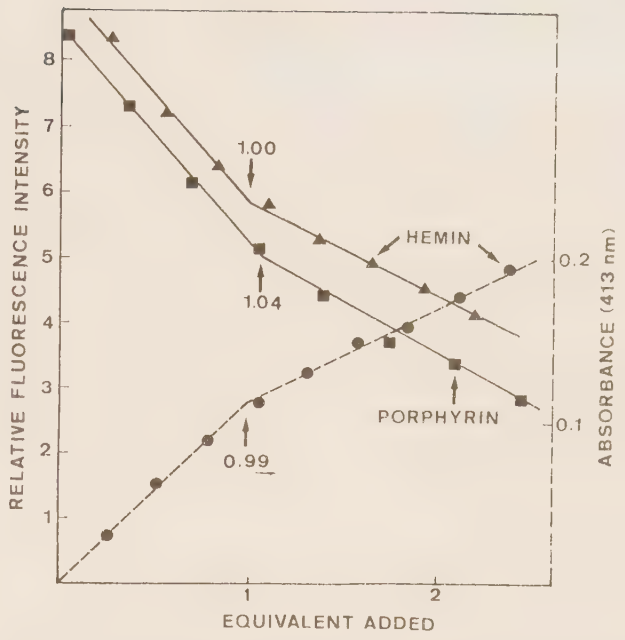


FIGURE 3: Binding of protoheme and protoporphyrin to apocytochrome b_2; the binding was followed by absorbance increase in the Soret band (413 nm) and by protein fluorescence quenching (excitation 295 nm, observation 325 nm). The concentration of the apoprotein was 1.41 μM. Conditions: 0.1 M Tris-HCl–1 mM EDTA (pH8.0), 25°.

to that of the holocytochrome b_2. These studies also showed that the binding of heme to the apoprotein did not affect the association state of the protein. From these remarks, we can conclude that the apocytochrome b_2 was in a "native" state.

A stoichiometric binding of protoheme to the apoenzyme has been observed by Mével-Ninio *et al.* (1971) as seen by both the absorbance increase in the Soret band and the protein fluorescence quenching (Figure 3). In a similar manner, we could observe that a stoichiometric binding of protoporphyrin to the apoprotein also occurs (Figure 3). The fluorescence properties of both the free and protein-bound protoporphyrin have been investigated, and it is shown in Figure 4 that they are markedly different. By mounting two polarizers, after the excitation slit and before the emission one, we could also measure the fluorescence polarization of protoporphyrin (excitation 510 nm, observation 628 nm) which was shown to increase from less than 1% with free porphyrin to 27% in the presence of apocytochrome b_2. This result, and those presented in Figure 4, indicate that protoporphyrin is tightly bound to the protein moiety. Nevertheless, we did not observe any sensitized fluorescence at 628 nm upon excitation at 295 nm. This is an indication of the lack of resonance transfer from tryptophans to heme (or porphyrin), and we shall discuss this point later on. It is worth noting that we did not observe any phosphorescence of the protoporphyrin, either free or bound to the protein, under our experimental conditions.

The relative P/F ratio of the apoenzyme was found to be 1.0 and the phosphorescence lifetime 6.3 sec, both of these values being the same as for free tryptophan.

Discussion

Let us first briefly recall the theory of resonance energy transfer developed by Förster (1959), which is valid for a $S \rightarrow S^1$ or a $T \rightarrow S$ transfer. The critical transfer distance, that is the distance at which the probability of energy transfer equals the probability of deexcitation by all other modes, is given by

$$R_0^6 \propto \phi K^2 J(\nu)$$

ϕ is the donor emission quantum yield; K^2 is an orientation factor which is maximum when the donor emission and acceptor absorption oscillators are parallel, and zero when they are perpendicular; $J(\nu)$ is an overlap integral defined by

$$J(\nu) = \int F_D(\nu)\epsilon_A(\nu)\frac{d\nu}{\nu^4}$$

where $F_D(\nu)$ is the donor spectral emission normalized to unity, and $\epsilon_A(\nu)$ the decadic molar extinction coefficient of the acceptor.

Some critical transfer distances involving tryptophan as a donor of fluorescence are available from the literature; in particular, R_0 was calculated to be 26 Å for the transfer Trp → oxidized FMN (Karreman *et al.*, 1958) and 37 Å for the transfer Trp → heme in carboxymyoglobin (Stryer, 1960). We can therefore calculate R_0 for the transfer Trp → heme in deflavocytochrome b_2 by comparing the overlap integral of this last system and those reported above. We thus found, for reduced deflavocytochrome b_2, values of 36 and 39 Å, respectively, by

[1] Abbreviations used are: S → S, singlet–singlet; T → S, triplet–singlet; T → T, triplet–triplet.

using the data of Karreman *et al.* (1958) and Stryer (1960). We shall therefore take for R_0 a mean value of 38 Å.

From this value, the critical transfer distance Trp → heme in phosphorescence (for a T → S transfer) can be estimated from the relation

$$\frac{R_{0P}^6}{R_{0F}^6} = \frac{\phi_P J(\nu)_P}{\phi_F J(\nu)_F}$$

where P and F refer to phosphorescence and fluorescence, respectively, the same orientation factor being assumed in both cases. The ratio $J(\nu)_P/J(\nu)_F$ was evaluated graphically, ϕ_P/ϕ_F is 0.25 at 77°K (Weber and Teale, 1965; Bishai *et al.*, 1967) so that R_{0P} is 34 Å for reduced deflavocytochrome b_2. This value of R_{0P} may seem high in view of the low phosphorescence quantum yield, but in fact the very high absorptivity of the heme Soret band causes the overlap integral $J(\nu)_P$ to be large, which compensates the decrease in quantum yield.

We can now compare these values of R_{0F} and R_{0P} to the molecular dimensions of the protein. From X-ray diffraction studies (Monteilhet and Risler, 1970) and electron microscopy data (L. Benedetti *et al.*, unpublished results; Burgoyne *et al.*, 1967), it is now clear that a molecule of cytochrome b_2 (235,000) is composed of four protomers, each bearing one heme and one FMN, and each having a spheroidal shape with a diameter of 40–45 Å. This value compares well with the critical transfer distances Trp → heme in fluorescence and phosphorescence.

The fluorescence studies performed by Iwatsubo and di Franco (1968) on holocytochrome b_2 and its deflavo derivative (hemoprotein) showed that there was no S → S energy transfer from tryptophans to heme since the protein fluorescence quenching is very low and does not depend on the reduction state of the heme in spite of the marked difference between its reduced and oxidized spectra. This is clearly supported by the fact that we have not detected any sensitized fluorescence of the protein-bound protoporphyrin upon excitation at 295 nm. Cytochrome b_2 thus appears as a unique hemoprotein in which the tryptophan fluorescence is not quenched by the heme and, considering the critical transfer distance calculated above, this cannot be explained by too great a distance between tryptophans and heme. It may thus be concluded that the orientation factor is responsible for this lack of fluorescence quenching.

The phosphorescence studies presented above have shown, in both the holocytochrome b_2 and its deflavo derivative, a quenching of the tryptophan phosphorescence (P/F = 0.4) and a marked (40%) reduction in its lifetime, whereas in the apoprotein this phosphorescence was identical with that of free tryptophan. Thus, the presence of the heme group considerably alters the protein phosphorescence. In fact, we cannot obtain direct evidence that this quenching is due to energy transfer from tryptophan to heme, since we could not measure the P/F ratio of the acceptor; protoheme is self-quenched and protophorphyrin phosphorescence was not detected in our apparatus. Moreover, $J(\nu)_F$ increases only by 9% when the heme is reduced, a value which is of the order of experimental uncertainty. It may thus be possible that the phosphorescence properties of the heme proteins, different from that of the apoenzyme, could arise from the influence of the environment of the indole residues. In this case, a conformational change affecting the tryptophan environment would occur upon binding of heme to the apoprotein.

Indeed, different values of the P/F ratios of tryptophan have been observed in papain (Weinryb and Steiner, 1970), trypsin

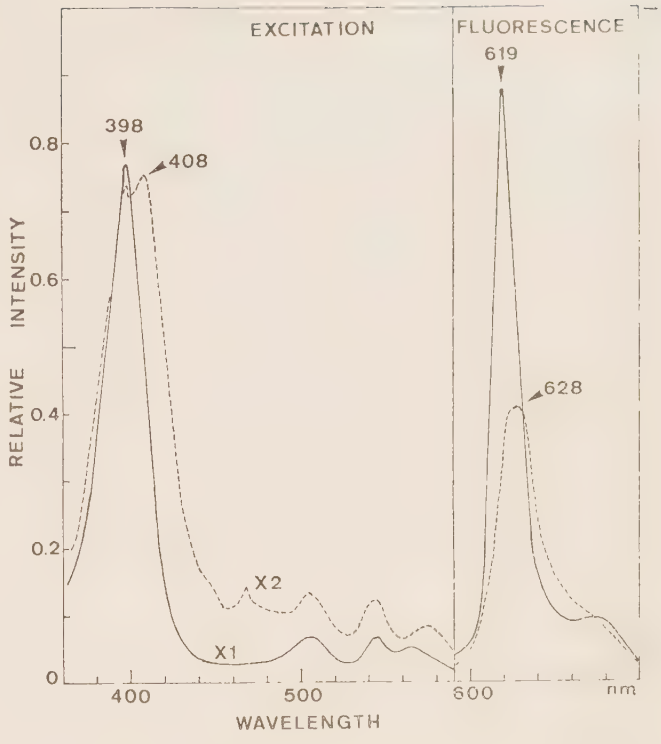


FIGURE 4: Fluorescence excitation spectra of free (——) protoporphyrin (observed at 619 nm) and protein-bound (---) protoporphyrin (observed at 628 nm), and fluorescence emission spectra of the same species. The excitation spectrum of the protein-bound porphyrin has been multiplied by a factor of 2. Same conditions as in Figure 3.

(Nag-Chaudhuri and Augenstein, 1964), and lysozyme (Longworth, 1966) but the phosphorescence lifetime was always practically equal to that of free tryptophan. A systematic study of Konev (1967) on one-tenth of the proteins, either native or denatured, also showed variations in the P/F ratios concomitant with a remarkable constancy in the phosphorescence lifetime. It was also shown, in a number of oligopeptides containing tryptophan, that its phosphorescence lifetime remained practically unchanged (Weinryb and Steiner, 1968; Steiner and Kolinsky, 1968). It thus seems that the influence of the peptide chain, if any, exerts a change on the rate of internal conversion rather than on the rate of return to the ground state. In this respect, the 40% decrease in the phosphorescence lifetime of holo- and deflavocytochrome b_2 is much bigger than in all the studies reported above, and therefore can be reasonably explained by an energy transfer from tryptophans to heme. Moreover, if the decrease in both the values of P/F and τ was not due to energy transfer, we would be confronted with the following situation. (i) The critical transfer distances Trp → heme in fluorescence and phosphorescence are practically equal to the molecular dimensions; (ii) the fluorescence and phosphorescence oscillators of tryptophan are perpendicular to each other, whereas (iii) neither the fluorescence nor the phosphorescence of tryptophans would be quenched by the heme groups. This would be most contradictory, and we thus think that the phosphorescence quenching in cytochrome b_2 can be reasonably and logically explained by an energy transfer from tryptophans to heme.

Does this transfer come from one or two, or from the four emitting tryptophans? In fact, the full three-dimensional structure of cytochrome b_2 is not yet available, and therefore we do not know whether all the tryptophans are close to each other and whether they are all oriented in the same direction.

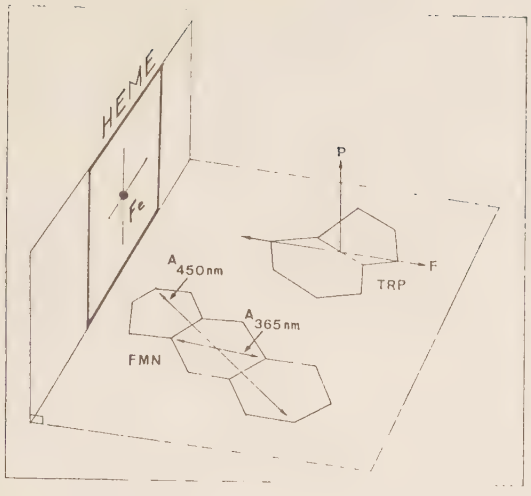


FIGURE 5: Tentative scheme showing the perpendicularity of the FMN and heme planes. This figure shows that (i) the fluorescence of tryptophan is quenched by FMN, not the phosphorescence and (ii) the phosphorescence of tryptophan is quenched by the heme, not the fluorescence. The relative positions of the chromophores are arbitrary.

However, the complete lack of fluorescence quenching by the heme group is extremely surprising and suggests the occurrence of a very particular spatial organization. We do not think that this lack of quenching could arise from a conformational change to a more expanded conformation in the deflavoprotein. In effect, if the distances and/or the orientations of tryptophans relative to heme were so strongly modified, upon removal of FMN, as to completely suppress the fluorescence quenching, these modifications would also affect the tryptophan phosphorescence quenching. This possibility can be eliminated since, as we have shown, the phosphorescence of the native and deflavoenzyme are identical. Also, it is important to note that we always observed a single phosphorescence lifetime in both the holo- and deflavocytochrome b_2, significantly different from that of free tryptophan; this lifetime is likely to be the mean value of several closely related lifetimes, which indicates that the tryptophans are affected roughly, if not exactly, in the same way by the heme groups, thus suggesting a similar distance and orientation relative to heme. This also implies that all the tryptophans are involved in energy transfer; should the phosphorescence of one or several indole residues be not quenched by the heme groups, their phosphorescence lifetime should be significantly higher and this would appear in the recordings of the phosphorescence decrease.

As far as the energy transfer from the tryptophans to the prosthetic flavin in the holocytochrome b_2 is concerned, a S → S transfer very likely occurs since the tryptophan fluorescence is 70% quenched by FMN (Iwatsubo and di Franco, 1968). On the contrary, there is obviously neither T → S nor T → T energy transfer from tryptophans to FMN since the phosphorescence properties (lifetime, P/F ratio) of the holocytochrome b_2 are identical with those of the deflavo derivative. Moreover, due to the calculated ratio $J(\nu)_P^{\text{FMN ox}}/J(\nu)_P^{\text{FMN red}}$ found to be 6.5, the tryptophan phosphorescence should increase considerably upon reduction of the prosthetic groups if energy transfer to FMN occurs. As it has been described above, this is not the case.

With the set of data presented in this paper, we are able to give a more precise picture of the relative orientations of heme, flavin, and tryptophans, since the positions of the various emission and absorption oscillators with which we are concerned are known; first, the two absorption oscillators of FMN corresponding to the 365-nm (which quenches the fluorescence) and 450-nm bands, lie in the isoalloxazine plane, making an angle of about 40° between them (Kurtin and Song, 1968); second, the γ (which quenches the phosphorescence) and δ absorption transition moments of protoheme are in the porphyrin plane (George and Griffith, 1961; Falk, 1964b) and third the fluorescence oscillator of tryptophan lies in the indole ring plane, whereas the phosphorescence oscillator is perpendicular to this plane (Konev, 1967). Thus, taking into account these data and ours, we arrive at the following interpretation: the indole planes are parallel to the isoalloxazine plane and perpendicular to the porphyrin ring (see Figure 5). In this case, the tryptophan phosphorescence is indeed quenched by the heme while the fluorescence is not. Moreover, the tryptophan fluorescence is quenched by FMN while the phosphorescence is not. It can therefore be concluded that the FMN and heme planes are roughly orthogonal.

As it was shown in the above discussion, the four emitting tryptophans in cytochrome b_2 probably present a great similarity in their distances and orientations relative to the heme, a fact which leads us to conclude that the FMN and heme planes are perpendicular. Of course, it would not be surprising if there did exist slight deviations between the different tryptophans, and what we are observing is actually a mean effect, thus making it impossible to give a precise value for the angle between heme and flavin. It is clear that the method we have described is best suited to proteins with low tryptophan contents, and we hope it may prove useful for elucidating relative orientations of chromophores in such proteins.

Acknowledgments

The author thanks Drs. F. Labeyrie and M. Iwatsubo for their constant help during the course of this work, Dr. P. Douzou for many helpful discussions, and A. di Franco for kindly correcting the manuscript.

References

Appleby, C. A., and Morton, R. K. (1954), *Nature (London) 173*, 749.

Baudras, A. (1965), *Biochem. Biophys. Res. Commun. 7*, 310.

Bishai, F., Kuntz, E., and Augenstein, L. (1967), *Biochim. Biophys. Acta 140*, 381.

Burgoyne, L. A., Dyer, P. Y., and Symons, R. H. (1967), *J. Ultrastructure Res. 20*, 20.

Falk, J. E. (1964a), *Porphyrins Metalloporphyrins 2*, 236.

Falk, J. E. (1964b), *Porphyrins Metalloporphyrins 2*, 85.

Förster, T. (1959), *Discuss. Faraday Soc. 27*, 7.

George, P., and Griffith, J. S. (1961), *in* Haematin Enzymes, Falk, J. E., Lemberg, R., and Morton, R. K., Ed., Oxford, Pergamon Press, p 139.

Grinstein, M. (1947), *J. Biol. Chem. 167*, 515.

Iwatsubo, M., and di Franco, A. (1965), *Bull. Soc. Chim. Biol. 47*, 891.

Iwatsubo, M., and di Franco, A. (1968), *in* Structure and Function of Cytochromes, Okunuki, M., Kamen, M. D., and Sekuzu, I., Ed., Baltimore, Md., Manchester, University Park Press, p 613.

Jacq, C., and Lederer, F. (1970), *Eur. J. Biochem. 12*, 154.

Karreman, G., Steele, R. H., and Szent-Györgyi, A. (1958),

Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 44, 140.
Konev, S. V. (1967), Fluorescence and Phosphorescence of Proteins and Nucleic Acids, New York, N. Y., Plenum Press, p 39.
Kurtin, W. E., and Song, P. S. (1968), *Photochem. Photobiol. 7*, 263.
Labeyrie, F., di Franco, A., Iwatsubo, M., and Baudras, A. (1967), *Biochemistry 6*, 1791.
Longworth, J. W. (1966), *Biopolymers 4*, 1131.
Mével-Ninio, M., Pajot, P., and Labeyrie, F. (1971), *Biochimie 53*, 35.
Monteilhet, C., and Risler, J. L. (1970), *Eur. J. Biochem. 12*, 165.
Nag-Chaudhuri, J., and Augenstein, L. (1964), *Biopolymers Symp. 1*, 441.
Pajot, P., and Groudinsky, O. (1970), *Eur. J. Biochem. 12*, 158.
Spyridakis, A., Naslin, L., and Labeyrie, F. (1971), *Biochimie 53* (in press).
Steiner, R. F., and Kolinsky, R. (1968), *Biochemistry 7*, 1014.
Stryer, L. (1960), *Radiat. Res., Suppl. 2*, 432.
Symons, R. H. (1965), *Biochim. Biophys. Acta 103*, 298.
Truong, T., Bersohn, R., Brumer, P., Luk, C. K., and Tao, T. (1967), *J. Biol. Chem. 242*, 2979.
Weber, G., and Teale, F. J. W. (1959), *Discuss. Faraday Soc. 27*, 134.
Weber, G., and Teale, F. J. W. (1965), *Proteins 3*, 485.
Weinryb, I., and Steiner, R. F. (1968), *Biochemistry 7*, 2488.
Weinryb, I., and Steiner, R. F. (1970), *Biochemistry 9*, 135.

II - 3 ARTICLE IV

Étude par dichroïsme circulaire des interactions hème-flavine-protéine dans le cytochrome b_2 (L-lactate oxydoréductase) de la levure

M. Iwatsubo et J. L. Risler

Centre de Génétique Moléculaire du Centre National de la Recherche Scientifique, Gif-sur-Yvette

(Reçu le 27 décembre 1968/17 mars 1969)

The circular dichroism spectra of bakers' yeast L-lactate dehydrogenase and some of its derivatives (without flavin and/or heme) have been investigated in order to obtain some information about the interactions between the prosthetic chromophores or between these chromophores and the protein moiety.

The following derivatives were studied: (a) the cytochrome b_2 (flavohemoprotein), (b) the apocytochrome b_2 (following FMN removal), (c) the *noyau cytochromique* b_2 (low molecular weight core isolated following proteolytic degradation), (d) the *apo-noyau cytochromique* b_2 (obtained by removal of the heme from the latter).

It is shown that the circular dichroism spectra of the protein moieties in the ultraviolet region (200—250 nm) are not affected, either by the removal of the flavin from the flavocytochrome b_2, or by the removal of the heme from the *noyau cytochromique* b_2. The significance of the values calculated for the α-helical content is discussed. The oxido-reduction state of the ferric ion does not affect the circular dichroism spectra in this region.

The circular dichroism bands associated with the heme chromophore are essentially the same in the apocytochrome b_2 and in the *noyau cytochromique* b_2, *i. e.* both without the flavin moiety, but are markedly changed in the flavocytochrome b_2, in particular with an inversion of the strong γ band.

Noticeable differences are observed with a homologous enzyme extracted from the yeast *Hansenula anomala*, especially in the γ band region.

In conclusion there appears to be no prosthetic group-protein interaction detectable by circular dichroism measurements, *i. e.* no important modification of the peptide bond geometry occurs when the flavin is removed from the enzyme or when the oxido-reduction state of the heme is varied. However, a strong effect is exerted by the flavin on the symmetry of the heme environment, this effect being probably an indirect one, *via* the protein moiety, as discussed in this paper.

Le cytochrome b_2 de la levure de boulangerie (L-lactate:cytochrome *c* oxydoréductase) a été obtenu pour la première fois à l'état cristallisé par Appleby et Morton [1] qui ont mis en évidence sa nature flavohémoprotéique. L'unité stable, de poids moléculaire 160000—190000, porte les groupes hème et FMN en quantités équimoléculaires [2,3]. La présence simultanée de ces 2 espèces de groupes prosthétiques, fait unique chez une déshydrogénase, a conduit à rechercher dans quelle mesure chacun est nécessaire à l'activité enzymatique et comment ils influencent la structure protéique. On sait [4—7] que la présence du FMN est indispensable (a) à l'activité déshydrogénasique; (b) à la réduction de l'hème par le L-lactate, substrat spécifique de l'enzyme [4—6] et qu'il est l'accepteur primaire d'électrons [7]. En ce qui concerne l'existence d'une interaction directe hème-FMN, les tentatives faites pour la détecter ont été dans l'ensemble négatives. En effet, la séparation du FMN ne modifie ni le potentiel d'oxydoréduction [6] ni le signal de résonance paramagnétique électronique [8] de l'hème et ne semble pas modifier les caractères spectraux, le spectre de l'holoenzyme paraissant purement additif en ce qui concerne la participation de la flavine et de l'hème. Cependant, Iwatsubo et di Franco [9] et indépendamment Sturtevant et Tsong [10] ont mis en évidence, par dispersion optique rotatoire, une modification des effets Cotton de l'hème liée à la présence du FMN prosthétique. Les méthodes de dichroïsme circulaire permettant une meilleure résolution des effets Cotton des différents chromophores, nous avons employé cette méthode

Enzymes. L-lactate : cytochrome *c* oxydoréductase ou cytochrome b_2 (EC 1.1.2.3).

pour comparer l'enzyme natif et ses différents dérivés, ainsi que les cytochromes b_2 extraits de deux levures différentes: *Saccharomyces cerevisiae* et *Hansenula anomala*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel

Cytochrome b_2 «*S*». Le cytochrome b_2 préparé à partir de la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae* (levures Springer) est cristallisé à l'état réduit par la méthode d'Appleby et Morton [1] puis recristallisé à l'état oxydé suivant la méthode de Morton et Shepley [11]. On appelle l'enzyme ainsi préparé, qui contient environ 6 % en masse de DNA, le cytochrome b_2 type I; après élimination du DNA suivant la méthode de Symons [12] on obtient le cytochrome b_2 type II.

Cytochrome b_2 «*H*». Baudras et Spyridakis [13] ont mis au point la préparation de la L-lactate déshydrogénase d'une autre levure: *Hansenula anomala*; cet enzyme est obtenu pur et sans DNA mais non cristallisé. Son activité enzymatique vis à vis du L-lactate (1400 sec^{-1} électrons/hème) est 5 à 6 fois plus grande que celle du cytochrome b_2 «S» cristallisé (250 sec^{-1} électrons/hème).

Apocytochrome b_2 «*S*». Comme l'ont montré indépendamment Morton [4] et Baudras [5], on peut obtenir une dissociation de la flavine prosthétique: on obtient ainsi un apocytochrome b_2. L'activité enzymatique peut être restaurée à 80 % de sa valeur initiale par addition de FMN à l'apoenzyme. Le complexe reconstitué peut être cristallisé comme l'enzyme natif [5].

Noyau cytochromique b_2. Par hydrolyse trypsique du cytochrome b_2 «S» [14] ou par stockage de l'enzyme à 0° [15], on obtient un fragment protéique de poids moléculaire 11—12000 auquel l'hème reste fixé comme dans le cytochrome b_2 lui-même [14]. Nous avons étudié le dérivé formé spontanément à 0°.

Apo-noyau cytochromique b_2. Par séparation de l'hème du noyau cytochromique b_2, on obtient l'apo-noyau cytochromique b_2 qui peut à nouveau fixer stoechiométriquement l'hémine pour donner un noyau cytochromique b_2 reconstitué [15].

Acide L-lactique. Préparé à partir de L-lactate de calcium (Calbiochem) dissous dans l'eau avec du Dowex 50-X2, passé sur une colonne de Dowex 50-X2 (forme acide) et neutralisé par NaOH. La concentration du L-lactate est mesurée enzymatiquement [16] en prenant $\Delta\varepsilon_{420}$ ferri-ferrocyanure = 1,04 $mM^{-1}cm^{-1}$.

Méthodes

Dichroïsme circulaire. Les spectres dichroïques sont déterminés au moyen d'un appareil Roussel-Jouan «Dichrographe II». A chaque longueur d'onde, la largeur de fente est ajustée de façon à ce que la bande passante n'excède pas 2 nm. Les ellipticités des bandes dichroïques sont exprimées en ellipticité molaire $\theta = 3300\ (\varepsilon_G - \varepsilon_D)$ deg × cm^2/décimole d'hème dans le visible et le proche ultraviolet, et en ellipticité molaire moyenne par résidu $\theta = 3300\ (\varepsilon_G - \varepsilon_D)$ 108/M deg × cm^2/décimole dans l'ultraviolet lointain. La masse molaire M par hème du cytochrome b_2 est prise égale à 78000 [6]; on prend 108 comme masse molaire moyenne d'un résidu, d'après la composition en acides aminés du cytochrome b_2 [17].

Mesure des concentrations. Les concentrations de cytochrome sont déterminées au moyen d'un spectrophotomètre Cary 15 en prenant comme absorbances millimolaires pour l'hème: $\varepsilon_{424} = 232\ mM^{-1}cm^{-1}$ [18] pour le ferrocytochrome b_2, $\varepsilon_{424} = 226\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ [6] pour l'apo-ferrocytochrome b_2, $\varepsilon_{413} = 125\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ [15] pour le ferri-noyau cytochromique b_2, et $\varepsilon_{280} = 12{,}5\ mM^{-1}\ cm^{-1}$ [15] pour l'apo-noyau cytochromique.

Activité enzymatique. L'activité pour l'accepteur ferricyanure est controlée à 420 nm avec un spectrophotomètre Zeiss muni d'un enregistreur Sargent L dans les conditions suivantes: tampon 66 mM phosphate, 0,33 mM EDTA, 66 mM D-L-lactate, 0,83 mM $K_3Fe(CN)_6$ (pH 7,5) et à 30°. Elle est exprimée en micromoles de ferricyanure réduites par seconde par une micromole d'hème de l'enzyme. Les préparations utilisées avaient des activités molaires de l'ordre de 250 sec^{-1}.

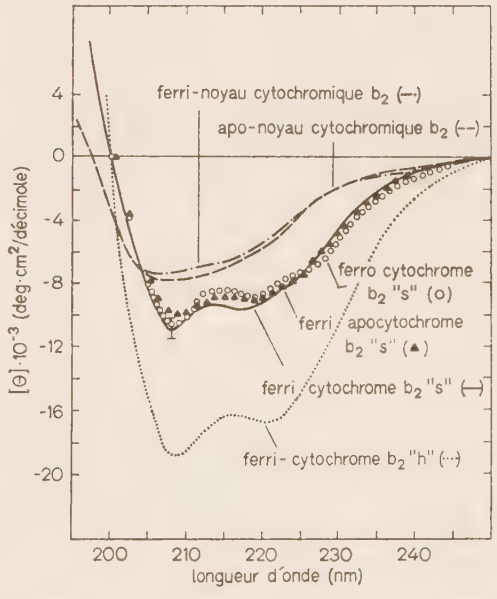


Fig. 1. *Spectres dichroïques dans l'ultra-violet lointain du cytochrome* b_2 «*S*», *de ses différents dérivés, et du cytochrome* b_2 «*H*». Noyau cytochromique 24,8 µM, apo-noyau cytochromique 24,0 µM, cytochrome b_2 «S» 3,9 µM, apo-cytochrome b_2 4,9 µM et cytochrome b_2 «H» 4,2 µM. Tampon 10 mM phosphate, 1 mM EDTA (pH 7,0), 23°

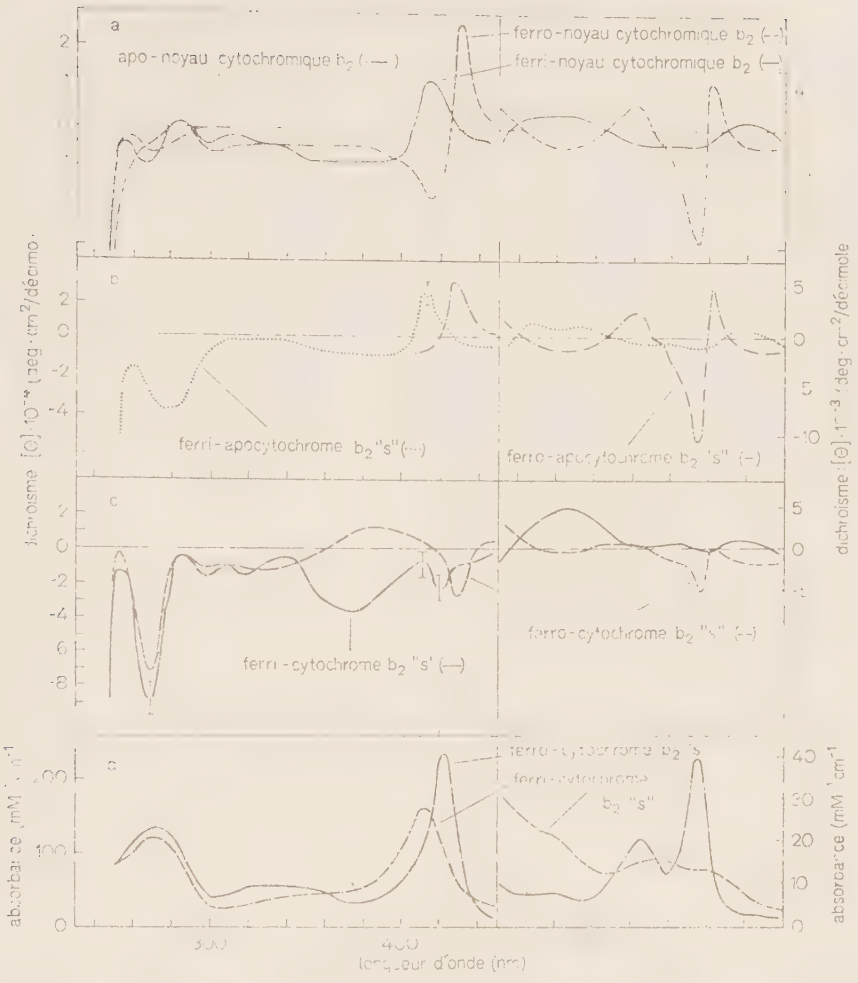


Fig.2. *Dichroïsme circulaire et absorbance du cytochrome* b_2 *«S» et de ses dérivés.* Noyau cytochromique 19.1 µM pour $\lambda < 450$ nm (à gauche) et 87.2 µM pour $\lambda > 450$ nm (à droite); apo-noyau cytochromique 31 µM. Cytochrome b_2 et apocytochrome b_2 types II respectivement 14,6 µM et 12,0 µM pour $\lambda < 450$ nm, 64.2 µM et 65,3 µM pour $\lambda > 450$ nm. Tampon 0,1 M phosphate. 1 mM EDTA (pH 7.2), 23°. Cytochrome b_2 réduit par L-lactate, apo-cytochrome b_2 réduit par dithionite. Pour $\lambda > 300$ nm, les spectres dichroïques, pour chaque composé de type I (avec DNA) ou de type II (sans DNA), sont exactement superposables

RÉSULTATS

Dichroïsme dans l'ultra-violet lointain

Toutes les mesures dans cette région sont effectuées sur les cytochromes b_2 et apocytochromes b_2 sans DNA (c'est à dire du type II). La Fig.1 montre les spectres dichroïques du cytochrome b_2 «S», de ses différents dérivés et du cytochrome b_2 «H». Les spectres du noyau cytochromique «S» et de son apoprotéine (sans hème) sont constitués d'une large dépression dont le minimum se situe entre 205 et 210 nm. Les spectres dichroïques du cytochrome b_2 «S», oxydé ou réduit par le L-lactate, et de son apoprotéine (sans FMN) sont très semblables et sont caractérisés par 3 minima à 208, 218 et 223 nm. Pour le cytochrome b_2 «H», on note 2 minima à 208 et 221 nm, sans minimum à 218 nm.

Dichroïsme dans le visible et le proche ultra-violet

Apo-noyau cytochromique b_2 *«S».* Cette protéine, qui ne contient aucun groupe prosthétique, manifeste une activité optique vers 280 nm (Fig.2) où l'on observe un minimum de faible ellipticité.

Noyau cytochromique b_2 «S». Les bandes α (560 nm) et β (530 nm) de l'hème oxydé (Fig.2) sont pratiquement inactives alors que la réduction provoque l'apparition d'effets intenses et superposés. Au niveau de la bande γ de l'hème (413 nm à l'état oxydé et 424 nm à l'état réduit), on observe une bande dichroïque positive. Quand l'hème est oxydé, on note un minimum à 270 nm qui disparaît par réduction.

Apocytochrome b_2 *«S».* Pour l'apoenzyme (Fig.2), les bandes α et β de l'hème ont le même comporte-

ment que pour le noyau cytochromique. L'activité optique de la bande γ est peu différente chez ces 2 composés, seule l'ellipticité est plus grande pour l'apoenzyme. Une bande positive entre 260 et 280 nm dûe au DNA disparaît chez l'apoenzyme type II: on peut alors observer un minimum centré à 280 nm.

Cytochrome b_2 «*S*». Comme pour le noyau cytochromique et l'apoenzyme, les bandes α et β de l'hème sont très peu actives (Fig.2). On note au niveau de la bande γ oxydée une bande négative non résolue. Le FMN prosthétique oxydé se manifeste par un minimum à 375 nm mais ne présente pas d'activité optique à 450 nm, à l'endroit de la bande d'absorption visible. La réduction simultanée des 2 groupes prosthétiques donne lieu à une profonde modification de toutes les bandes dichroïques. Aux

DISCUSSION

Examinons tout d'abord les résultats obtenus dans l'ultra-violet lointain: les spectres dichroïques des cytochromes b_2 «S» et «H» (Fig.1) présentent des minima (208, 218 et 222 nm) considérés comme caractéristiques des structures α et β [19,20]. En fait, il semble assez illusoire de vouloir estimer les proportions de ces différentes structures puisque le cytochrome *c* présente ces mêmes minima [21,22] alors qu'il ne possède pas de régions en structure α [23,24].

Par contre, il est intéressant de noter que, dans la région 200—240 nm (qui est la zone d'absorption des liaisons peptidiques), l'hème et la flavine semblent n'avoir aucune influence sur l'ensemble des chromophores peptidiques; ceci est démontré par l'identité des spectres dichroïques (Fig.1) obtenus (a) entre le

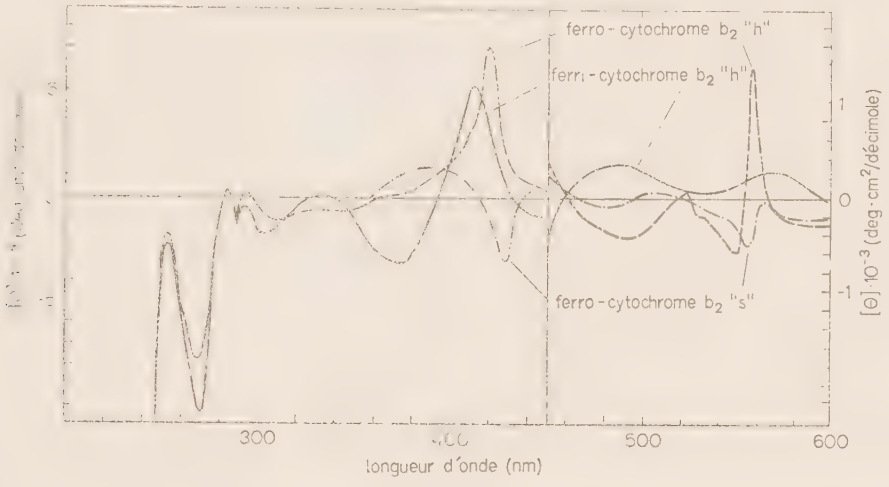


Fig.3. *Dichroïsme circulaire du cytochrome* b_2 «*H*». Concentrations: 11,0 µM pour $\lambda < 450$ nm (à gauche) et 88,0 µM pour $\lambda > 450$ nm (à droite). Conditions expérimentales: *cf.* Fig.2. Le spectre dichroïque du cytochrome b_2 «S» a été redessiné à partir de la Fig.2

bandes α et β de l'hème réduit correspondent des effets relativement intenses et superposés, et à la flavine réduite un large pic centré à 385nm. Au niveau de la bande γ de l'hème réduit, on observe une bande symétrique et négative alors qu'elle était positive sur l'apocytochrome b_2, en l'absence de flavine prosthétique.

On observe également chez l'enzyme type II un minimum de grande amplitude, centré à 270 nm, qui est absent chez le noyau cytochromique et l'apoenzyme.

Cytochrome b_2 «*H*». L'identification des bandes dichroïques (Fig.3) se fait comme pour le cytochrome b_2 «S». On note une plus grande ellipticité au niveau des bandes α et β de l'hème réduit, cependant que pour la bande γ de l'hème on observe un pic positif à l'état oxydé comme à l'état réduit, donc différent de ce qui a été observé pour le cytochrome b_2 «S».

noyau cytochromique b_2 et le dérivé sans hème correspondant d'une part: (b) d'autre part entre le cytochrome b_2 «S» et l'apo-cytochrome b_2 «S» sans flavine. Cependant, la fixation de la flavine à l'apo-enzyme doit provoquer un changement de conformation puisque les solubilités du cytochrome b_2 [6] sont très différentes en présence ou en absence de FMN; on peut donc en conclure que cette modification de structure n'affecte la géométrie que d'un nombre restreint de liaisons peptidiques, ce qui n'exclut pas l'hypothèse que la transconformation globale puisse être importante. Toujours dans l'ultra-violet lointain, la fixation du substrat — donc la réduction des groupes prosthétiques — n'affecte pas le dichroïsme du cytochrome b_2 «S».

Dans la zone du spectre visible hématinique, qui recouvre celui de la flavine lorsqu'elle est présente, on a pu constater un fait très important: le comportement de l'hème du cytochrome b_2 «S» est tout à fait

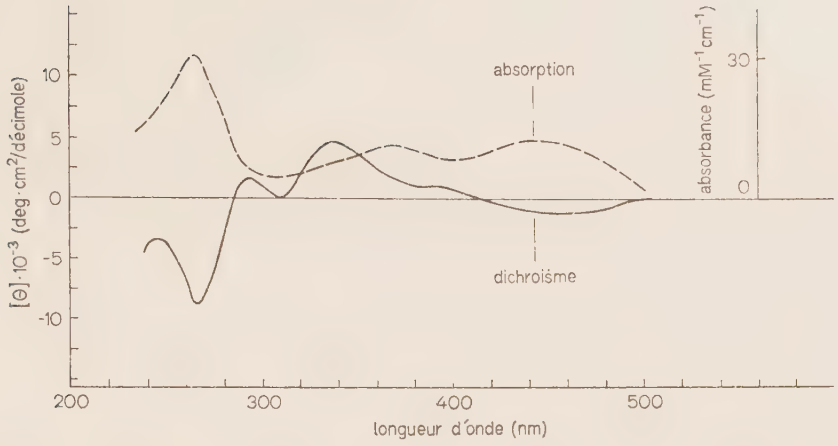


Fig. 4. *Spectre dichroïque et absorbance du FMN libre oxydé.* Concentration: 106 µM. Conditions expérimentales: *cf.* Fig. 2

différent en absence et en présence du FMN fixé à la protéine. A l'état réduit (hème et flavine tous deux réduits), on observe au niveau de la bande γ du flavocytochrome b_2 un effet négatif alors que pour l'apocytochrome b_2 sans FMN on a un effet inverse positif. Cette inversion de la bande hématinique s'observe aussi, quoique moins nettement, à l'état oxydé. Il apparaît donc que la fixation du FMN à l'apocytochrome b_2 induit une modification de l'environnement électronique de l'hème. Il y a tout lieu de penser qu'il s'agit d'un effet indirect; en effet, l'hème et le FMN prosthétiques ne semblent pas très proches l'un de l'autre: (a) la vitesse apparente de transfert d'électrons de l'un à l'autre apparaît comme étant faible [7]; (b) la fluorescence protéique est fortement éteinte par la flavine et très peu par l'hème [9]. La fixation du FMN à l'apoenzyme (qui change la solubilité) provoque donc un changement conformationnel dans la protéine, cette modification produisant un bouleversement de la répartition des charges autour de l'hème.

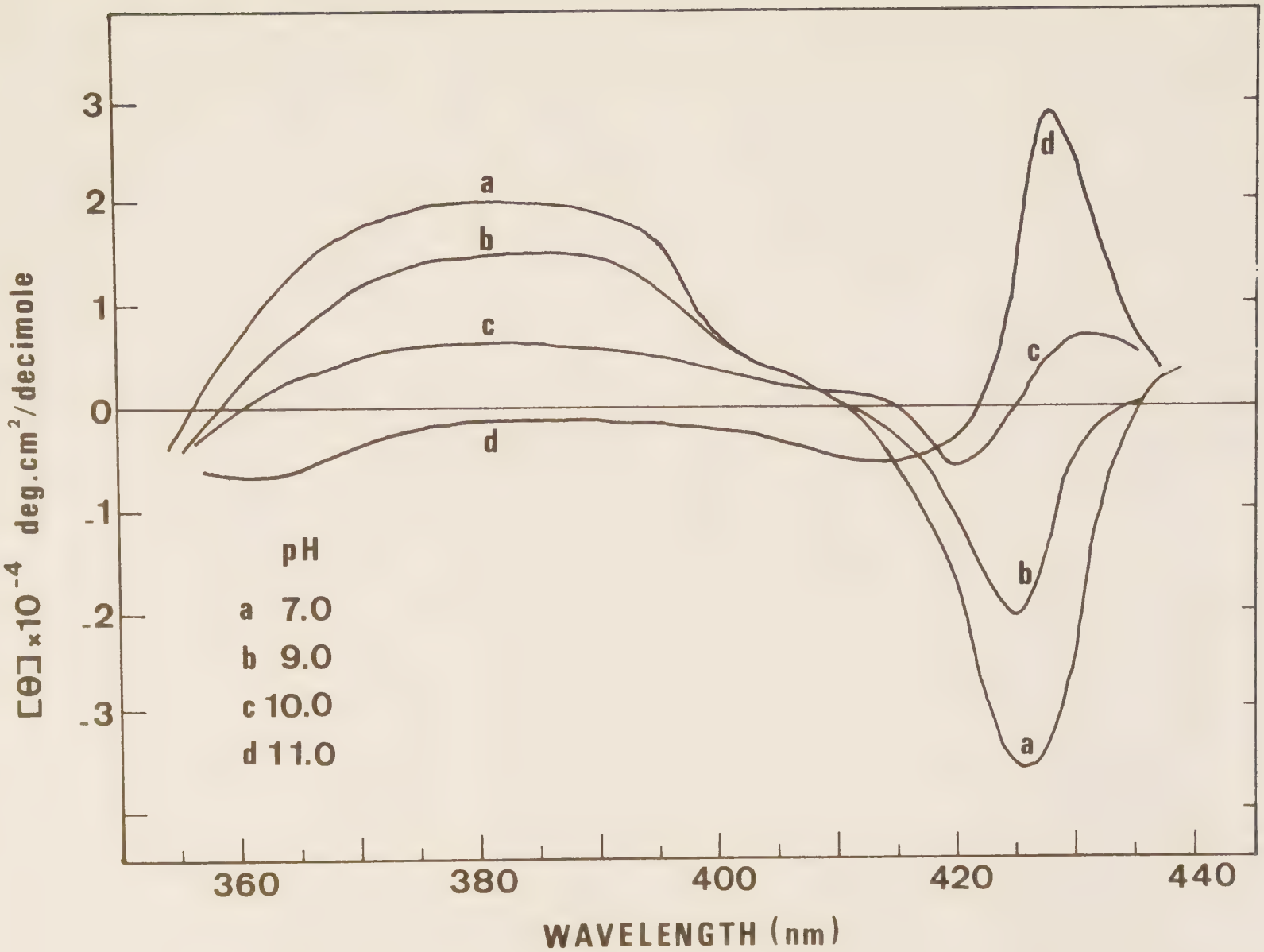
Dans la zone 270—300 nm, d'habitude celle des chromophores protéiques tyrosine et tryptophane, il faut noter dans le flavocytochrome b_2 la part prédominante des chromophores hème et flavine. La participation de l'hème — qui absorbe dans cette région [14,25,26] — est démontrée par la comparaison du noyau cytochromique et de son dérivé privé d'hème (Fig. 2). Pour les cytochromes *c* extraits de divers organismes, deux bandes dichroïques positives vers 250—270 nm [21,22,26,27] ont été attribuées [22] au complexe fer-porphyrine-histidine. Ces bandes sont absentes chez le noyau cytochromique b_2, bien qu'une histidine soit également impliquée dans la fixation de l'hème [28]. Dans la même zone, une bande négative très intense, à 270 nm, n'est observable que chez le flavoenzyme (Fig. 2): elle est due vraisemblablement au FMN qui absorbe dans cette région (Fig. 4), mais cette bande n'a jamais été signalée chez une flavoprotéine. On pourrait concevoir, mais l'interprétation paraît moins vraisemblable, qu'il s'agit d'un effet de la flavine sur une bande de l'hème comme celui qu'on observe dans la bande γ.

En ce qui concerne l'enzyme homologue de *Hansenula anomala* (Fig. 3), on observe un effet positif au niveau de la bande γ, alors que le même effet est négatif chez le flavocytochrome b_2 «S». L'environnement de l'hème est donc différent chez les deux cytochromes b_2 «S» et «H». Rappelons que l'activité spécifique du cytochrome b_2 «H» est 5 à 6 fois plus grande que celle du cytochrome b_2 «S»: on peut se demander s'il y a une relation de cause à effet entre ces deux résultats et si la structure de ce site hématinique est très critique pour la fonction enzymatique.

Nous remercions vivement Madame F. Labeyrie, dans le laboratoire de laquelle ce travail a été réalisé, et le Dr. E. Shechter, avec qui nous avons eu de nombreuses et fructueuses discussions. Le cytochrome b_2 «H» nous a été obligemment fourni par le Dr. A. Baudras et A. Spyridakis. Les mesures ont été effectuées sur un appareil mis à notre disposition par M. V. Luzzati. Mlle Y. Vicente nous a apporté une très habile contribution technique. Ce travail a bénéficié d'une subvention de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique.

BIBLIOGRAPHIE

1. Appleby, C. A., et Morton, R. K., *Nature*, 173 (1954) 749.
2. Appleby, C. A., et Morton, R. K., *Biochem. J.* 73 (1959) 539.
3. Armstrong, J. Mc D., Coates, J. H., et Morton, R. K., *Biochem. J.* 86 (1963) 136.
4. Morton, R. K., *Nature*, 192 (1961) 727.
5. Baudras, A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 7 (1962) 310.
6. Baudras, A., *Bull. Soc. Chim. Biol.* 47 (1965) 1143.
7. Iwatsubo, M., Baudras, A., di Franco, A., Capeillère, C., et Labeyrie, F., In *Flavins and Flavoproteins* (edited by K. Yagi), University Park Press, Baltimore-Manchester 1968, p. 41.
8. Watari, H., Groudinsky, O., et Labeyrie, F., *Biochim. Biophys. Acta*, 131 (1967) 592.


3
2
1
0
-1
-2
-3
[θ] ×10⁻⁴ deg.cm²/decimole
a
b
c
d
pH
a 7.0
b 9.0
c 10.0
d 11.0
360
380
400
420
440
WAVELENGTH (nm)

9. Iwatsubo, M., et di Franco, A., In *Structure and Function of Cytochromes* (edited by K. Okunuki, M. D. Kamen, I. Sekuzu), University Park Press, Baltimore-Manchester 1968, p. 613.
10. Sturtevant, J. M., et Tsong, T. Y., *J. Biol. Chem.* 243 (1968) 2359.
11. Morton, R. K., et Shepley, K., *Biochem. J.* 89 (1963) 257.
12. Symons, R. H., *Biochim. Biophys. Acta*, 103 (1965) 298.
13. Baudras, A., et Spyridakis, A., résultats non publiés.
14. Labeyrie, F., Groudinsky, O., Jacquot-Armand, Y., et Naslin, L., *Biochim. Biophys. Acta*, 128 (1966) 492.
15. Labeyrie, F., Di Franco, A., Iwatsubo, M., et Baudras, A., *Biochemistry*, 6 (1967) 1791.
16. Labeyrie, F., Slonimsky, P. P., et Naslin, L., *Biochim. Biophys. Acta*, 34 (1959) 262.
17. Lederer, F., communication personnelle.
18. Morton, R. K., Armstrong, J. McD., et Appleby, C. A., In *Haematin Enzymes* (edited by J. E. Falk, R. Lemberg et R. K. Morton), Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris 1961, p. 501.
19. Holzwarth, G., et Doty, P., *J. Am. Chem. Soc.* 87 (1965) 218.
20. Townend, R., Kumosinski, T. F., Timasheff, S. N., Fasman, G. D., et Davidson, B., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23 (1966) 163.
21. Shechter, E., et Saludjian, P., *Compt. Rend.* 264 (1967) 1501.
22. Flatmark, T., et Robinson, A. B., in *Structure and Function of Cytochromes* (*cf.* ref. [9]), p. 318.
23. Dickerson, R. E., Kopka, M. L., Weinzierl, J. E., Varnum, J. C., Eisenberg, D., et Margoliash, E., *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 3015.
24. Dickerson, R. E., Kopka, M. L., Weinzierl, J. E., Varnum, J. C., Eisenberg, D., et Margoliash, E., in *Structure and Function of Cytochromes* (*cf.* ref. [9]), p. 225.
25. Shechter, E., et Saludjian, P., *Compt. Rend.* 261 (1965) 5089.
26. Urry, D. W., in *Structure and Function of Cytochromes* (*cf.* ref. [9]), p. 331.
27. Hamaguchi, K., Ikeda, K., et Narita, K., in *Structure and Function of Cytochromes* (*cf.* ref. [9]), p. 328.
28. Groudinsky, O., Communication personnelle.

M. Iwatsubo et J. L. Risler
Centre de Génétique Moléculaire du C.N.R.S.
F-91 Gif-sur-Yvette, France

II - 3 - 1 Additif à l'article IV

Comme on vient de le voir, on admettait au moment où l'article précédent a été écrit que l'hème et le FMN pouvaient être relativement éloignés l'un de l'autre. Quand furent obtenues les nouvelles données concernant la structure du cytochrome b_2 et ses propriétés de luminescence (articles 1 - 2 - 3), cette interprétation des premiers résultats de fluorescence se trouva remise en question. Nous avons alors pensé que l'inversion de la bande γ de l'hème lors de l'enlèvement de la flavine pouvait être due à un couplage entre les oscillateurs d'absorption de ces deux groupes. En effet, selon la théorie développée principalement par Urry (42, 43), une grande partie de l'activité optique d'une transition dans un chromophore "A" peut provenir d'une interaction entre cet oscillateur et celui d'une autre transition dans un chromophore "B". Dans cette théorie des oscillateurs couplés, la force rotatoire de la transiton "a" due au couplage avec la transiton "b" serait :

$$R_{a,b} \propto \frac{\vec{r}_{a,b} \cdot \vec{\mu}_b \wedge \vec{\mu}_a}{\nu_b^2 - \nu_a^2}$$

où $r_{a,b}$ est la distance entre l'origine des transitions, μ_a et μ_b les moments de transition électriques, ν_a et ν_b les fréquences des transitions. Comme le numérateur fait intervenir un produit mixte, nous aurons $R_{a,b} = - R_{b,a}$. Les bandes dichroiques des transitions a et b seront donc de signes opposés et de forces rotatoires égales.

C'est bien ce que l'on observe, pour le cytochrome b_2 réduit, au niveau des bandes centrées à 425 nm (hème) et à 375 nm (FMN) et qui est montré dans la figure ci-contre : en élevant le pH de la solution, on libère la flavine de l'enzyme. Il s'ensuit une diminution de la bande à 375 nm du FMN, concomitante avec une augmentation (- ⟶ +) de la bande de Soret de l'hème. On pouvait donc penser à un couplage entre ces deux transitions ; ceci aurait impliqué une grande proximité des deux oscillateurs (le phénomène varie selon r^{-6}), donc des deux groupes prosthétiques.

Cependant M. Mével-Ninio montrera plus tard (résultats non publiés) que le dichroisme de la flavine est le même dans le cytochrome b_2 natif et dans son dérivé sans hème portant seulement le FMN. Par conséquent la bande dichroique centrée à 375 nm, due à la flavine, ne peut provenir d'un couplage avec l'hème. Le problème de la distance hème-FMN reste donc entier.

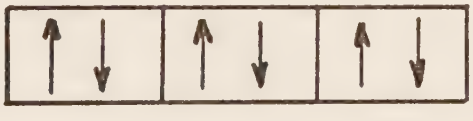
II - 4 ETUDE DU CYTOCHROME b_2 PAR DICHROISME CIRCULAIRE MAGNETIQUE

II - 4 - 1 Introduction

Comme nous venons de le voir, le dichroisme circulaire naturel (DC) ne nous a pas permis de conclure à l'existence d'une interaction directe entre l'hème et la flavine. J'ai donc examiné ce problème par une méthode spectroscopique différente, le dichroisme circulaire magnétique (DCM).

Contrairement à ce que pourraient laisser penser leurs noms, les deux phénomènes (DC et DCM) sont de nature totalement différente. La seule analogie entre les deux méthodes est que, dans les deux cas, on mesure une différence d'absorption pour la lumière polarisée circulaire droite et la lumière polarisée circulaire gauche. Le DCM étant une technique récente encore peu employée, il peut être utile de rappeler brièvement son origine physique.

On sait que l'état énergétique d'un électron est caractérisé par quatre nombres quantiques dits principal (n), secondaire (l), magnétique (m) et de spin (s). Deux électrons d'un même atome ne peuvent avoir leurs quatre nombres quantiques égaux. Considérons par exemple les électrons d'une sous-couche 3p. La représentation classique est la suivante :



Pour tous ces électrons, n = 3 et l = 1. Le spin des électrons peut être égal à + 1/2 ($\uparrow$) ou - 1/2 ($\downarrow$). Les électrons se groupent par paires dans des "cases" caractérisées chacune par leur nombre quantique magnétique, qui peut prendre ici les valeurs -1,0 et +1 ($-1 \leqslant m \leqslant +1$).

En l'absence de tout champ magnétique, l'énergie de ces 6 électrons est la même. Si l'on place maintenant l'atome dans un champ magnétique extérieur H, chaque électron acquiert une énergie supplémentaire proportionnelle à H et à m. Les niveaux énergétiques qui étaient confondus (état dégénéré) se voient séparés. On dit que la dégénérescence est levée par l'établissement du champ magnétique (schéma 1).

Schéma 1

Ce phénomène est appelé effet Zeeman.

Excitons maintenant cet atome par de la lumière, et faisons subir aux électrons des transitons optiques. Considérons une transition ayant lieu à partir d'un état fondamental, s (m = 0, l = 0) non dégénéré vers un état excité p (l = 1, m = 0, ± 1) dégénéré. En l'absence de tout champ magnétique, nous avons une seule raie d'absorption (schéma 2)

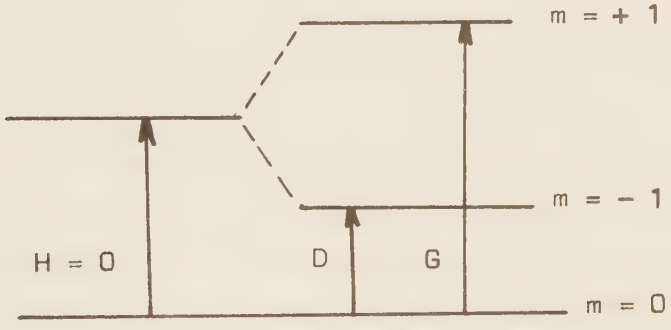


Schéma 2

En présence du champ magnétique extérieur apparaitront deux nouvelles transitions, symétriques par rapport à la précédente, car la dégénérescence de l'état excité a été levée.

Il faut maintenant remarquer qu'un photon est considéré en mécanique quantique comme une "particule" de masse nulle, mais douée de spin. La lumière circulaire droite est composée de photons ayant un spin +1, la lumière circulaire gauche de photons ayant un spin -1. Par ailleurs, le principe de la conservation des moments exige que l'ensemble (atome + photon) garde un moment constant. Il s'ensuit que la transition $m = 0 \longrightarrow m = 1$ ($\Delta m = -1$) sera due uniquement à l'absorption de lumière circulaire droite ($S = +1$) et que la transition $m = 0 \longrightarrow m = +1$ ($\Delta m = +1$) sera due uniquement à l'absorption de lumière circulaire gauche ($S = -1$). La différence entre les intensités de ces deux absorptions est le dichroisme circulaire magnétique.

On pourra trouver dans la littérature (44, 45, 46) une description plus détaillée et plus quantitative du phénomène.

On voit donc que le DCM doit son existence à l'établissement d'un champ magnétique intense extérieur à la molécule que l'on étudie. Le dichroisme magnétique existe donc toujours, que cette molécule soit optiquement active ou non. De plus, le DCM d'un chromophore ne dépend que de ses états électroniques et non pas de la symétrie (ou dissymétrie) du champ électromagnétique, autre que le champ extérieur, dans lequel il baigne ; le DCM sera donc insensible aux variations de l'environnement d'un chromophore tant que ces variations n'affectent pas la nature de ses états électroniques. C'est la raison pour laquelle cette méthode est peu utilisée lors d'études conformationelles. Au contraire, l'insensibilité du DCM aux changements de conformation en fait une technique que l'on peut utiliser de façon complémentaire avec le dichroisme naturel. Ainsi, nous avons vu que l'enlèvement de la flavine du cytochrome b_2 provoque une inversion de la bande de Soret (due à l'hème) en dichroisme naturel. Vraisemblablement, ce phénomène est imputable à un remaniement de la structure de la protéine autour de l'hème : tout mouvement de résidus polaires ou de cycles aromatiques proches de l'hème entrainera une modification du champ électromagnétique local. Mais ceci peut aussi cacher, ou se superposer à, des changements dans la structure électronique du noyau porphyrine : si l'hème et la flavine sont très proches l'un de l'autre et s'il existe entre eux des interactions fortes, on peut imaginer que le départ du FMN puisse provoquer de tels changements. Ceux-ci seraient alors détectables en dichroisme circulaire magnétique, l'influence de la protéine sur l'hème étant ici éliminée.

II - 4 - 2 Article V

Magnetic circular dichroism studies of cytochrome c and cytochrome b_2

J.L. Risler and O. Groudinsky

(soumis à Eur. J. Biochem)

SUMMARY

In spite of the very different conformation of the polypeptide chain around the heme - ligand chelate, the magnetic circular dichroism (MCD) spectra of native cytochrome c and of its heme undecapeptide dissolved in 3.3 M N-acetyl DL-methionine are identical in the Soret region. This indicates that the MCD spectrum of the heme group (in the Soret band) is not sensitive to changes in the protein conformation as long as the proper ligands are bound to the iron atom.

On the contrary, the MCD spectrum of holocytochrome b_2 differs from that of its derivatives lacking the FMN group ; in the Soret region a MCD band at 365 nm, observed only with the holoenzyme, is assigned to the δ absorption band of the heme group rather than to a flavin transition. If, as shown with cytochrome c, the MCD spectra are independant of the protein conformation, the apparition of this band upon binding of FMN can be tentatively explained by a perturbation exerted on the heme group by the flavin itself. This would imply a close proximity of the two prosthetic groups.

INTRODUCTION

As first shown by Morton [1], Boeri [2] and their collaborators, bakers' yeast L-lactate dehydrogenase (or cytochrome b_2) is remarkable in that it is both a dehydrogenase and a b-type cytochrome, and carries both FMN and protoheme as prosthetic groups. The catalytic mechanism of this tetrameric protein [3-5] is not yet fully understood ; however, it could be demonstrated that both the prosthetic groups are necessary for the catalytic activity (-as long as cytochrome c is the acceptor) and that the electrons are transferred from the FMN moiety to the heme group [6,7]. The elucidation of the structural relationships between heme and FMN is thus of crucial importance for the understanding of the mode of action of cytochrome b_2. As a first attempt toward this goal, the native protein was compared with its derivatives : deflavo-cytochrome b_2 devoided of FMN, apocytochrome b_2 lacking both heme and FMN, and cytochrome b_2 core, a low molecular weight derivative carrying only one heme. A number of spectroscopic methods were used, such as absorptiometry [8], electron spin resonance [9], fluorescence and phosphorescence [10,11] and circular dichroism [12-14]. In all these studies, no interaction between heme and FMN could be unambiguously detected.

If the two prosthetic groups are very close to one another, one can expect a certain amount of mixing of porphyrin and isoalloxazine orbitals, which would probably lead to modifications in the electronic structures. Since magnetic circular dichroism provides informations about the electronic states of chromophores [15], this method was resorted to as another spectroscopic tool.

MATERIAL AND METHODS

Enzymes. Type II (DNA-free) cytochrome $\underline{b}_2$, deflavo-cytochrome b_2 and cytochrome b_2 core were prepared as described previously [16-19]. Cytochrome $\underline{c}$ undecapeptide was obtained by peptic digestion of commercial horse-heart cytochrome c (Sigma type III) according to Margoliash et al. [20]. Cytochrome $\underline{b}_5$ from pig liver microsomes was a gift of Dr. R. Labbe. The concentrations of the proteins were measured either with a Cary model 15 or with a Bausch & Lomb Spectronics spectrophotometer. The following absorptivity values were used : $\varepsilon_{413} = 129\ mM^{-1}cm^{-1}$ for ferricytochrome $\underline{b}_2$, $\varepsilon_{413} = 120\ mM^{-1}cm^{-1}$ for deflavo-cytochrome $\underline{b}_2$, $\varepsilon_{413} = 120\ mM^{-1}cm^{-1}$ for ferricytochrome $\underline{b}_2$ core, $\varepsilon_{413} = 117\ mM^{-1}cm^{-1}$ for ferricytochrome $\underline{b}_5$ and $\varepsilon_{410} = 106\ mM^{-1}cm^{-1}$ for ferricytochrome $\underline{c}$.

Circular dichroism. Magnetic circular dichroism (MCD) spectra were recorded with the apparatus designed by Billardon [21], using a permanent magnet giving a magnetic field of 7 200 gauss. The propagation direction of the light beam was along the positive direction of the magnetic field. The bandwidth of the apparatus was set at 6 Å in all experiments. The results, expressed in terms of molar absorptivity differences ($\varepsilon_L - \varepsilon_R = \Delta\varepsilon\ M^{-1}cm^{-1}$) are normalized to unit magnetic field. Natural circular dichroism (CD) was measured either with the same apparatus in the absence of magnetic field or in a Roussel-Jouan Dichrograph II unit [14] and was subsequently substracted from the measured MCD. Results are expressed in molar ellipticity $\theta = 3\ 300\ \Delta\varepsilon$ deg.cm^2/decimole.

RESULTS

Magnetic circular dichroism of cytochrome c and heme undecapeptide.

In a first step, we wanted to see whether a change in the heme protein environment could be detected by MCD. In this respect, the heme undecapeptide obtained by peptic digestion of cytochrome c is a good model ; indeed, the conformation of the polypeptide chain around the heme group is very different for native cytochrome c and for its heme peptide. This is well illustrated in fig. 1 which shows the CD of these two species in the Soret band ; it is obvious that the spectra are different. On the contrary, we observed that the MCD spectrum of native cytochrome c in the same region (fig. 2) is reproducibly identical to that of its heme peptide dissolved in 3.3 M N-acetyl DL-methionine, both in amplitude and position. For comparison, the MCD in the Soret band of heme undecapeptide dissolved in 1 M imidazole is also presented in fig. 2 ; the change of a methionine sulfur for an imidazole nitrogen as the sixth iron ligand is reflected both in absorption and MCD by a significant shift in the wavelength of the bands and by an increased amplitude of the signals. In the α and β bands (fig. 3) both the absorption and MCD spectra are different for cytochrome c, methionine-undecapeptide and imidazole-undecapeptide.

Magnetic circular dichroism of cytochrome b_2 and its derivatives.

The MCD spectra corresponding to the α and β bands of cytochrome b_2, its deflavoderivative and its heme peptide (cytochrome b_2 core) -all in their oxidized state- are shown in fig. 4, together with that of cytochrome b_5. To obtain these spectra, great care had to be taken to fully oxidize the heme since as low as 1 % of the reduced form is easily detected by MCD (see also [22]). The cytochromes were therefore oxidized by an excess of ferricyanide, which was removed by filtration on a Sephadex G-25 column immediately before the experiments. In addition, no EDTA was added to the phosphate buffer in order

to avoid any photoreduction of the flavin. In these conditions, no reduced form appeared during the data collection. The spectra thus obtained exhibit slightly different amplitudes for the four different species, but they are nevertheless qualitatively similar. The presence of FMN in the holocytochrome $\underline{b}_2$, which is responsible for the higher absorption around 450 nm, does not produce noticeable changes in MCD. Indeed the MCD of FMN at 450 nm, either free in solution [23] or bound to the protein moiety of flavodoxin (Risler and Groudinsky, unpublished results) is extremely weak ($\Delta\varepsilon \simeq 10^{-5}{}_M{}^{-1}{}_{cm}{}^{-1}{}_G{}^{-1}$). On the contrary the weak absorption transition at 480 nm, attributed to the heme chromophore [24], gives a relatively intense peak in MCD ($\Delta\varepsilon = 70\ 10^{-5}{}_M{}^{-1}{}_{cm}{}^{-1}{}_G{}^{-1}$).

The MCD spectra obtained with the same species in the Soret region are shown in fig. 5. Here the MCD spectra of deflavo-cyctochrome $\underline{b}_2$ and cytochrome $\underline{b}_2$ core, both lacking the FMN group, are almost exactly identical. However, the holocytochrome $\underline{b}_2$ behaves differently and gives an additional negative band around 365 nm. This point will be further discussed later on.

That MCD enables hidden or weak absorption bands to be revealed is very clear from the figures. In particular, figs. 2 and 5 show that the Soret band of cytochrome $\underline{b}_2$, cytochrome $\underline{b}_5$ and cytochrome $\underline{c}$ is actually composed of at least three different transitions. By a study at low temperature (down to 6°K) of cytochrome $\underline{b}_2$ core, Briat et al. [25] could show that the S shape of the Soret band is due to two terms of opposite signs, the third transition appearing as a shoulder around 380 nm. It should also be noted that cytochrome $\underline{b}_5$ gives spectra very similar to those of cytochrome $\underline{b}_2$ core (figs 4 and 5, see also [26]).

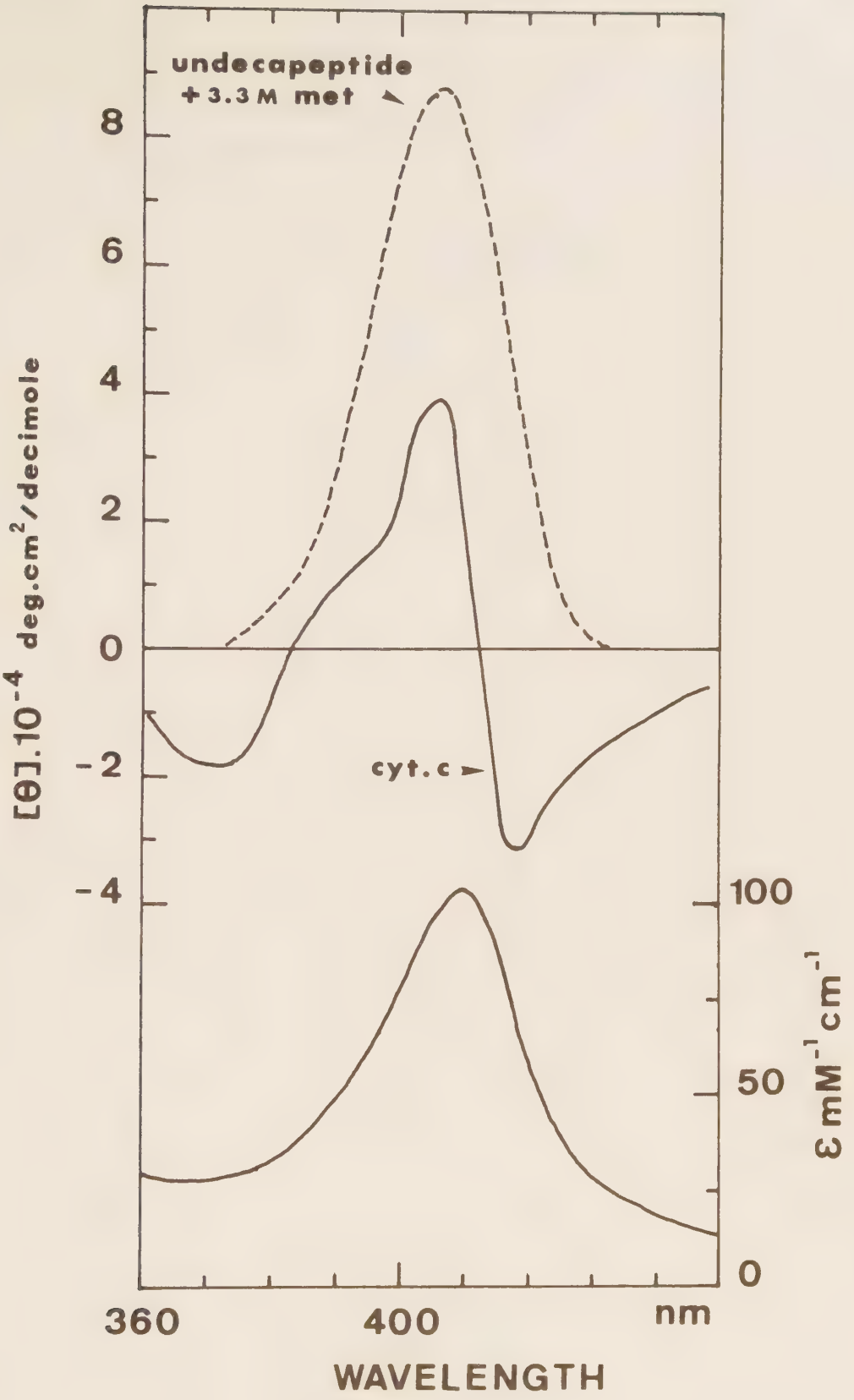


Figure 1. Circular dichroism of cytochrome c and heme undecapeptide. Cytochrome c (15.1 μM) was dissolved in 0.1 M phosphate, pH 7.0, in a 1 cm cuvette (———); In order to minimise aggregation of heme undecapeptide and to maximise binding of N-acetyl DL-methionine, heme undecapeptide was dissolved at a concentration of $7.5\ 10^{-7}$ M in 3.3 M N-acetyl DL-methionine, 0.1 M phosphate, pH 7.0, and the spectrum was recorded using a 10 cm cuvette (— — — —). The absorption spectrum in the Soret band is the same for both species.

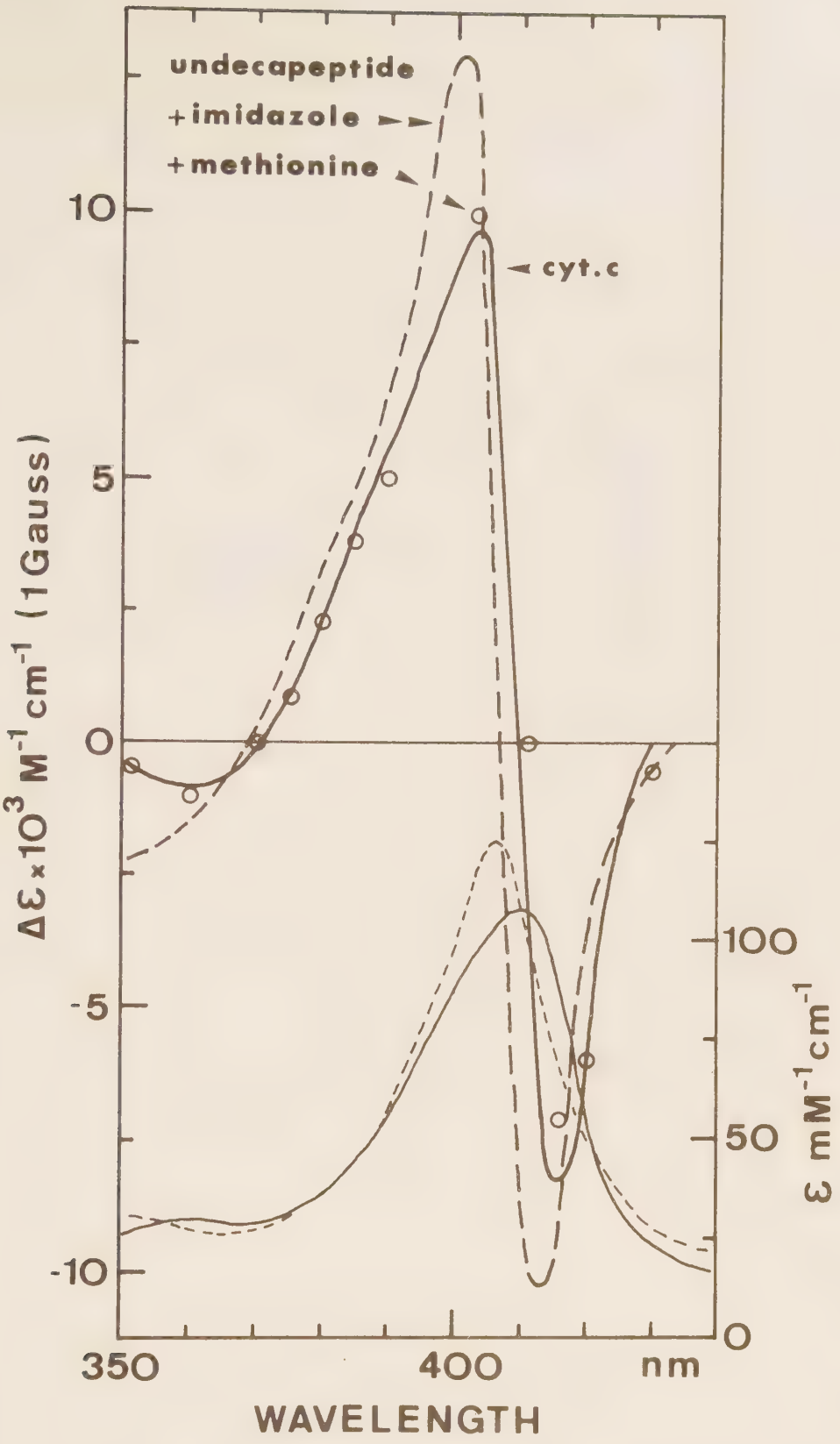


Figure 2. Magnetic circular dichroism and absorption spectra of cytochrome c and heme undecapeptide in the Soret band. Cytochrome c (——) was dissolved in 0.1 M phosphate, pH 7.0; Heme undecapeptide was dissolved either in 3.3 M N-acetyl DL-methionine (○ ○) or in 1 M imidazole (– – – –), both solvents buffered at pH 7.0 with 0.1 M phosphate. The light path was 1 mm.

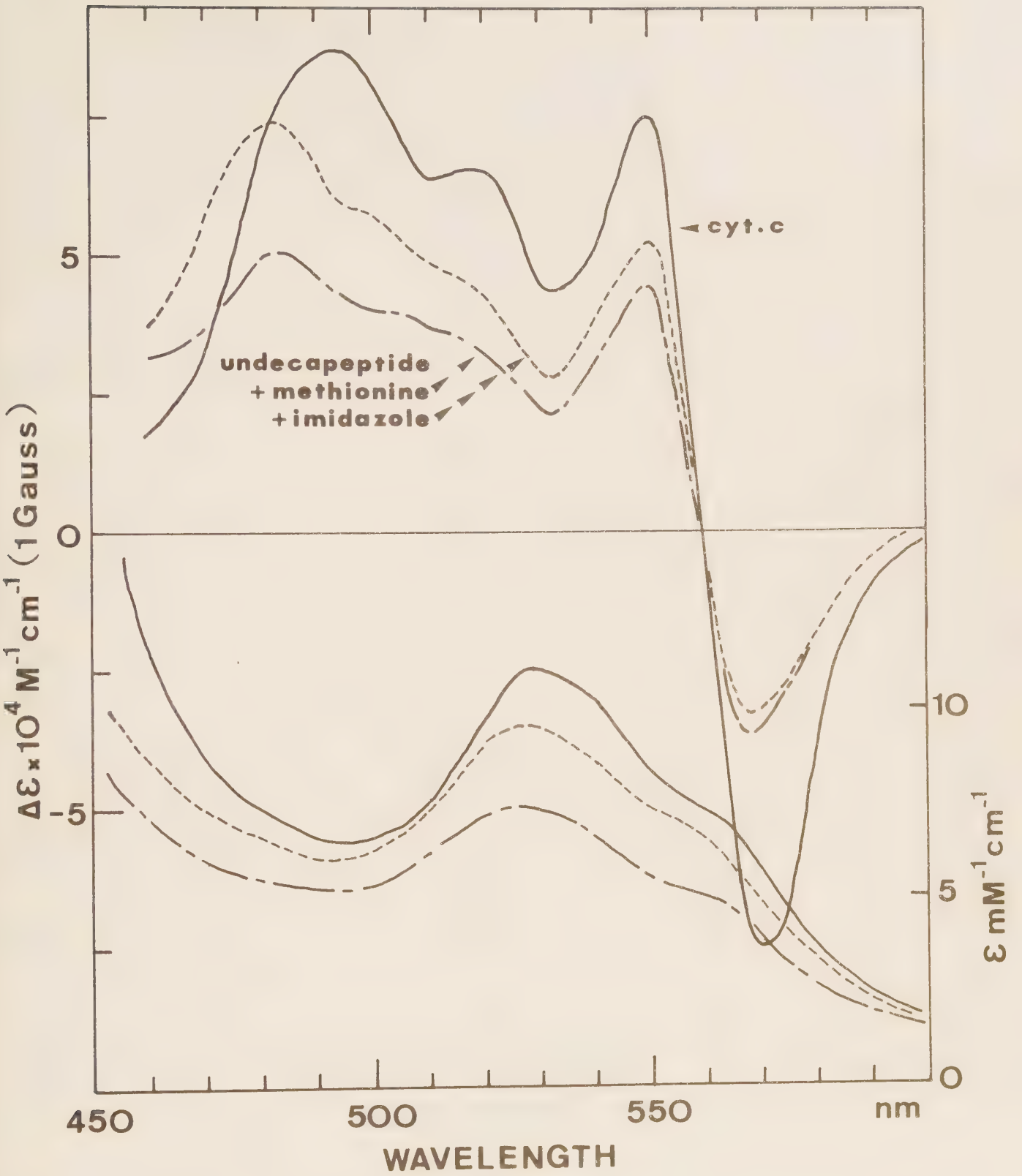


Figure 3. Magnetic circular dichroism and absorption spectra in the visible region of cytochrome c (———), methionine-heme undecapeptide (– – –) and imidazole-heme undecapeptide (– – – –). Same conditions as in fig. 2.

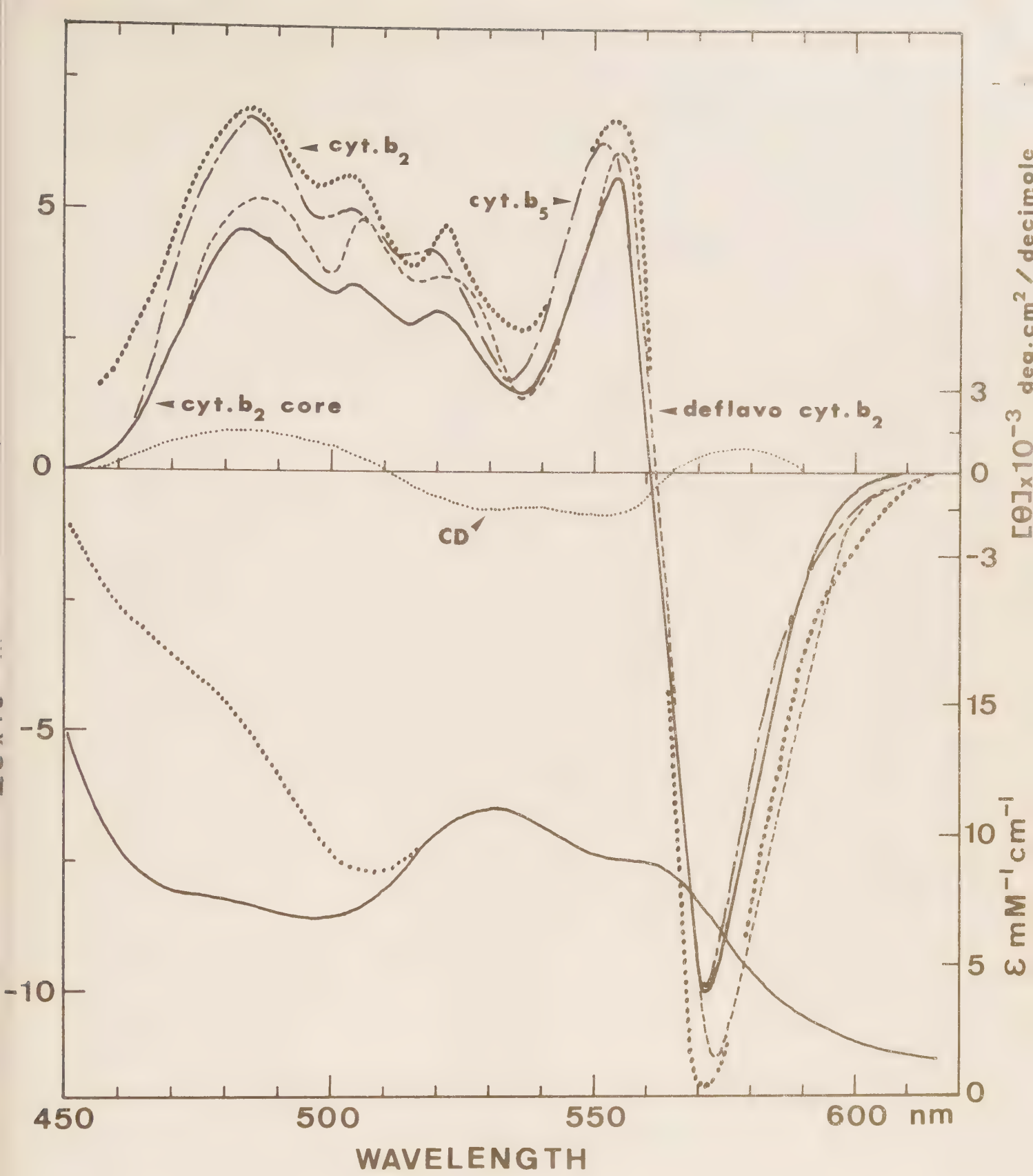


Figure 4. Magnetic circular dichroism spectra in the visible region of cytochrome b_2 (.....), deflavo-cytochrome b_2 (- - - -), cytochrome b_2 core (———) and cytochrome b_5 (- ——-). The circular dichroism spectrum of cytochrome b_2 (.....) is also presented. The absorption spectrum of cytochrome b_2 core (———) is very similar to that of deflavo-cytochrome b_2 and cytochrome b_5; Holocytochrome b_2 absorbs more strongly around 450 nm (.....), due to the presence of FMN. All the proteins were dissolved in 0.1 M phosphate, pH 7.0. The light path was 1 mm.

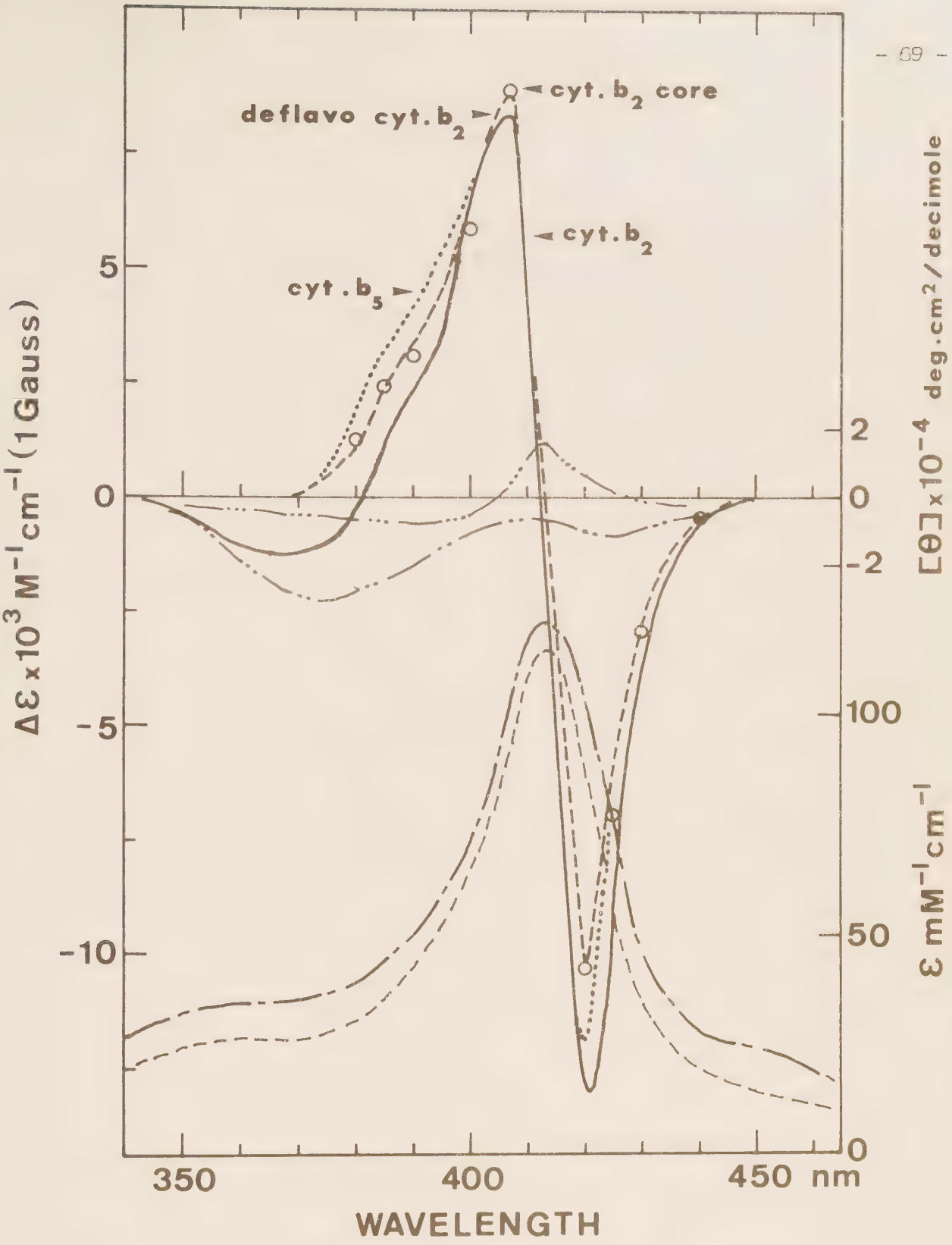


Figure 5. Magnetic circular dichroism spectra in the Soret band of cytochrome b_2 (———), deflavo-cytochrome b_2 (– – – –), cytochrome b_2 core (O O) and cytochrome b_5 (.....). Natural circular dichroism spectra of cytochrome b_2 (·· ———) and deflavo-cytochrome b_2 (··· ———) are also presented. For the sake of clarity, only the absorption spectra of cytochrome b_2 (– ——– –) and cytochrome b_2 core (– – – –) are presented. All the proteins were dissolved in 0.1 M phosphate, pH 7.0. The light path was 1 mm for MCD and 1 cm for CD and absorption.

DISCUSSION

As already pointed out by several authors [15, 27, 28] the origin of the differential absorption of left and right circularly polarized light is very different in natural CD and magnetic CD. In the former case (CD) the dichroism of a chromophore is due to the dissymetry of the local electromagnetic field ; this dissymetry can be either intrinsic or induced by the surroundings, for instance by polar amino acid side-chains in the vicinity of the chromophore. On the contrary, magnetic CD depends only on the nature of the ground and excited states of the chromophore, the degeneracies of which are split by the external magnetic field (Zeeman effect). It can then be predicted that MCD will not be sensitive to changes in the surroundings of a chromophore in so far as these modifications do not affect its energy levels. This is well illustrated by the present study of cytochrome c and its heme peptide. In native cytochrome c, the fifth and sixth iron coordination positions are respectively occupied by a histidine nitrogen and a methionine sulfur [29] ; in the undecapeptide, the fifth iron ligand (histidine) is still present but the sixth iron coordination position is free [20]. If the heme peptide is dissolved in a concentrated solution of N-acetyl DL-methionine, the absorption spectrum of cytochrome c can be recovered [30]. This indicates that N-acetyl Dl-methionine is most probably linked by its sulfur atom to the sixth coordination position of iron. It is clear, however, that apart from the fifth and sixth iron ligands themselves, the heme environment provided by the amino acid side-chains is quite different in native cytochrome c and in its methionine-undecapeptide ; this is reflected in the CD spectra of these two species (fig. 1). On the contrary the results presented in fig. 2 indicate that the MCD of the Soret band is highly sensitive to the nature of the iron ligands, but not to the heme protein environment. The situation is not that clear in the visible region (fig. 3) where the MCD of the α and β bands cannot be clearly correlated

to the nature of the iron ligands or to the protein conformation. In the study of cytochrome $\underline{b}_2$ and its derivatives, we shall therefore focus our attention on the Soret region.

Interestingly, the MCD spectra of deflavo-cytochrome $\underline{b}_2$ and cytochrome $\underline{b}_2$ core are identical (fig. 5). This reinforces the view that the iron ligands are the same in both species [26]. Moreover, these spectra are very similar to that of cytochrome $\underline{b}_5$ -an additional spectroscopic analogy between the two cytochromes [26]. However the MCD spectrum of holocytochrome $\underline{b}_2$ (which contains FMN) is different since an additional band is observed at 365 nm (fig. 5). This band could be due *a priori* either to the FMN or to the heme group : a) the 375 nm transition in the isoalloxazine ring gives rise to a MCD band in free FMN [23] and in FMN bound to flavodoxin (Risler and Groudinsky, unpublished results). However, this band has a very small amplitude ($\Delta\varepsilon \simeq 10^{-4}\ M^{-1}cm^{-1}G^{-1}$) in both cases, about ten times smaller than the 365 nm band in cytochrome $\underline{b}_2$; b) an identical band around 360 nm can be seen in the MCD spectrum of cytochrome $\underline{c}$ (fig. 2) where no flavin is present ; it probably corresponds to the δ absorption transition of the heme ; c) preliminary studies of holocytochrome $\underline{b}_2$ performed by B. Briat (unpublished results) showed an increase in the amplitude of this MCD transition with decreasing temperature, thus indicating a paramagnetic term. Since the prosthetic groups were fully oxidized by an excess of ferricyanide just before the experiments, it is very unlikely that this band would be due to a flavin semiquinone. Hence it seems quite sound to ascribe the MCD band at 365 nm to the δ transition of the cytochrome $\underline{b}_2$ heme.

As already deduced from CD experiments [12-14], the binding of FMN to deflavo-cytochrome b_2 induces a modification of the heme environment. It is conceivable that this modification of the CD spectrum (see fig. 5) would be due to a conformational change of the protein, bringing an amino acid side-chain very close to the porphyrin ring ; this would explain the change in the MCD spectrum upon binding of FMN. Since the three-dimensional structure of

cytochrome $\underline{b}_2$ is not known, such a possibility cannot be ruled out. However we have seen that the MCD spectra of cytochrome c and of its methionine-heme undecapeptide are identical (fig. 2) ; similarly it is probable -yet not certain- that structural modifications of the protein moiety in cytochrome b_2 would not be detected in the MCD of the heme group. In this case the appearance of the MCD band at 365 nm upon FMN binding would be due to a perturbation directly exerted upon the heme by the flavin itself. This would imply a close proximity of the two prosthetic groups.

Such a conclusion seems to be at variance with earlier results obtained from stopped-flow kinetic experiments ; assuming that no flavin semiquinone participates in the catalytic reaction, the rate-constant for the intramolecular electron transfer FMN ⟶ heme was calculated to be 100-200 sec^{-1} [6]. This rather slow transfer was interpreted in terms of remoteness of the prosthetic groups. However the above calculation is likely to be erroneous since it has been recently shown by R.C. Bray and C. Blandin-Capeillère (unpublished results) that a flavin semiquinone is probably involved in the catalytic mechanism of cytochrome $\underline{b}_2$; this was deduced from rapid-freezing electron spin resonance studies : within the time-scale of the experiments ($\sim 10^{-3}$ sec) the reduction of the heme is concomitant with the reoxidation of the reduced flavin to its semiquinone form. Hence the electron transfer FMN ⟶ heme seems to be very rapid, an observation which reinforces the view that the two prosthetic groups are close to one another.

We therefore tentatively conclude that the observed difference in the MCD spectra of the holo and deflavo cytochrome $\underline{b}_2$ is due to a direct interaction between the heme and flavin groups. In addition the porphyrin ring and the isoalloxazine planes are probably perpendicular [11] ; however it is not possible at this stage to give a more precise description of their spatial relationships.

ACKNOWLEDGMENTS

We are greatly indebted to Dr. B. Briat for his help and stimulating discussions, and to Dr. F. Labeyrie for her interest and many constructive criticisms. Thanks are also due to Drs. J. Thiery, E. Schechter and J.M. Jallon for their interesting remarks. This work constitutes a part of a Doctoral Thesis (Doctorat ès Sciences) to be submitted by one of us (JLR) to the Faculté des Sciences d'Orsay.

REFERENCES

1 - Appleby, C.A., & Morton, R.K. (1954) Nature 173, 749-752.

2 - Boeri, E., Cutolo, E., Luzzati, M., & Tosi, L. (1955) Arch. Biochem. Biophys. 56, 487-499.

3 - Jacq, C., & Lederer, F. (1970) Eur. J. Biochem. 12, 154-157.

4 - Pajot, P., & Groudinsky, O. (1970) Eur. J. Biochem. 12, 158-164.

5 - Monteilhet, C., & Risler, J.L. (1970) Eur. J. Biochem. 12, 165-169.

6 - Iwatsubo, M., Baudras, A., di Franco, A., Capeillère, C., & Labeyrie, F. (1968) in Flavins and Flavoproteins (Yagi, K., ed), pp. 41-58, University Park Press, Baltimore, Md., Manchester.

7 - Forestier, J.P., & Baudras, A. (1971) in Flavins and Flavoproteins (Kamin, H., ed), pp. 599-605, University Park Press, Baltimore, Md., Butterworths, London.

8 - Baudras, A. (1965) Bull. Soc. Chim. Biol. 47, 1143-1176.

9 - Watari, H., Groudinsky, O., & Labeyrie, F. (1967) Biochim. Biophys. Acta 131, 592-594.

10 - Iwatsubo, M., & di Franco, A. (1968) in Structure and Function of Cytochromes (Okunuki, K., Kamen, M.D., & Sekuzu, I., eds), pp. 613-625, University Park Press, Baltimore, Md., and Manchester.

11 - Risler, J.L. (1971) Biochemistry 10, 2664-2669.

12 - Tsong, T.Y., & Sturtevant, J.M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 2397-2402.

13 - Sturtevant, J.M., & Tsong, T.Y. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4942-4950.

14 - Iwatsubo, M., & Risler, J.L. (1969) Eur. J. Biochem. 9, 280-285.

15 - Djerassi, C., Bunnenberg, E., & Elder, D.L. (1971) Pure Appl. Chem. 25, 57-90.

16 - Morton, R.K., & Shepley, K. (1963) Biochem. J. 89, 257-262.

17 - Spyridakis, A., Naslin, L., & Labeyrie, F. (1971) Biochimie 53, 195-205.

18 - Baudras, A. (1962) Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 310-314.

19 - Labeyrie, F., di Franco, A., Iwatsubo, M., & Baudras, A. (1967) Biochemistry 6, 1791-1797.

20 - Margoliash, E., Frohwirt, N., & Wiener, E. (1959) Biochem. J. 71, 559-570.

21 - Billardon, M., Rivoal, J.C. & Badoz, J. (1969) Rev. Phys. Appl. 4, 353-364.

22 - Shashoua, V.E. (1965) Arch. Biochem. Biophys. 111, 550-558.

23 - Tollin, G. (1968) Biochemistry 5, 1720-1727.

24 - Brill, A.S., & Williams, R.J.P. (1961) Biochem. J. 78, 246-253.

25 - Briat, B., Berger, D., & Leliboux, M. (1972) J. Chem. Phys., in press.

26 - Groudinsky, O. (1972) Thesis, Paris.

27 - Briat, B., & Djerassi, C. (1968) Nature 217, 918-922.

28 - Coleman, J.E., & Coleman, R.V. (1972) J. Biol. Cgem. 247, 4718-4728.

29 - Dickerson, R.E., Takano, T., Eisenberg, D., Kallai, O.B., Samson, L., Cooper, A., & Margoliash, E. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1511-1535.

30 - Schechter, E., & Saludjian, P. (1967) Biopolymers 5, 788-790.

CONCLUSION GENERALE

Nous avons vu, au cours de l'exposé précédent, que certains points particuliers concernant la structure du cytochrome b_2 cristallisé ont pu être résolus. Plus précisément, il semble maintenant fermement établi que cette protéine est un tétramère de masse molaire 235-240 000 possèdant une symétrie moléculaire 222. L'identité stricte (en séquence et en structure) des 4 protomères n'a pas encore été démontrée, mais pour le moment rien n'indique le contraire. Vraisemblablement, seules des études de séquence et de diffraction X permettront de résoudre cette question.

En ce qui concerne plus spécifiquement l'hème et la flavine, et s'il nous a été possible de préciser leur orientation relative, nous n'avons pas pu déterminer de façon précise la distance qui les sépare. Si ces deux groupes prosthétiques sont très proches l'un de l'autre, on peut encore imaginer l'expérience suivante pour le mettre en évidence : on sait qu'il est possible de détacher réversiblement le FMN de la protéine (18) ; on peut alors tenter de refixer sur le déflavo-cytochrome b_2 un dérivé du FMN portant un label de spin paramagnétique. Si la fixation a lieu de sorte que ce label soit proche de l'hème, la perturbation paramagnétique due au fer hématinique sera détectable par résonance paramagnétique électronique. Il faut cependant remarquer que cette méthode présente à priori le même désavantage que toutes celles qui ont été utilisées jusqu'à présent : un résultat négatif n'impliquerait pas nécessairement que les 2 groupes prosthétiques soient éloignés l'un de l'autre.

Evidemment, il existe une méthode de choix pour résoudre de nombreux problèmes liés à la structure et à la fonction du cytochrome b_2 : c'est la diffraction des rayons X à haute résolution. Malheureusement les deux types de cristaux dont nous disposons actuellement se prêtent fort mal à une étude de ce type ; les cristaux quadratiques (type I) sont beaucoup trop petits pour qu'on puisse en faire des diagrammes de cristal unique ; en outre, les cristaux trigonaux (type II) ont une molécule entière (235 000 daltons) par unité asymétrique, donc une maille très grande, et ils supportent très mal l'irradiation par les rayons X. J'ai donc procédé à plus d'une centaine d'essais de cristallisation pour obtenir : a) soit des cristaux quadratiques d'une taille raisonnable, b) soit, en jouant sur la force ionique ou sur la présence de solvants organiques, une forme cristalline nouvelle dans laquelle la molécule de cytochrome b_2 utiliserait la symétrie du cristal. Tous ces essais se sont révélés négatifs.

En fait, il est possible que cet echec ait finalement été heureux. En effet, on sait maintenant que le cytochrome b_2 cristallisé -celui que j'ai étudié- subit une attaque protéolytique au cours de la préparation (47). Il s'ensuit que le protomère de 57 000 daltons, composé d'une seule chaine dans l'enzyme "physiologique" est coupé dans l'enzyme cristallisé en deux chaines distinctes (39, 48) de masses molaires 19-22 000 et 33-39 000. Ces chaines restent néanmoins associées en l'absence d'agents dénaturants. La différence ainsi créée entre les structures des enzymes physiologique et cristallisé se manifeste notamment au niveau de leurs paramètres cinétiques (14, 47). Pour le moment, on ignore totalement l'influence de l'attaque protéolytique sur la structure tertiaire de la chaine peptidique.

Il semble donc plus raisonnable, pour étudier en détail la structure de cette protéine, de mener les essais de cristallisation soit sur l'enzyme physiologique, soit sur un autre cytochrome b_2 extrait de la levure Hansenula anomala, qui ne subit pas non plus d'attaque au cours de la préparation (49). Les toutes premières tentatives de cristallisation de ces deux cytochromes b_2 ont lieu au moment de la présente rédaction (50). A priori, il n'y a aucune raison pour que l'un au moins de ces deux enzymes ne puisse être obtenu sous forme cristalline.

En fait, la question que l'on doit se poser est la suivante : qu'apporterait l'élucidation de la structure du cytochrome b_2 ? L'investissement représenté par une telle étude serait-il justifié par des résultats importants et originaux ? ou bien le cytochrome b_2 ne serait-il alors qu'une protéine de plus qu'on ajouterait à la collection des enzymes ayant fait l'objet d'une étude cristallographique ? Pour ma part, il ne fait aucun doute qu'un tel travail présenterait un grand intérêt. Il permettrait en effet d'éclaircir les points suivants :

1) Le cytochrome b_2 est une déshydrogénase à flavine. Actuellement, aucune protéine de ce type n'a été soumise à une étude structurale. Il serait donc du plus haut intérêt de connaitre le mode de fixation du FMN à la chaine peptidique et de comprendre comment les électrons peuvent passer du lactate à la flavine. En outre, il deviendrait possible de comparer cette structure à celle de la flavodoxine -transporteur d'électrons flavinique- dont l'étude cristallographique est en cours (51, 52). Bien que la spécificité et l'origine de ces deux enzymes soient différentes, la mise en évidence d'une analogie structurale serait d'un grand intérêt du point de vue

évolutif. Rappelons que de telles analogies ont été observées chez des enzymes de spécificités aussi différentes que la trypsine, la chymotrypsine et l'élastase (53).

2) Comme son nom l'indique, le cytochrome b_2 est aussi un cytochrome, de type b. On connait maintenant en détail la structure du cytochrome b_5 extrait des microsomes du foie de porc (54, 55). Or, les données dont on dispose actuellement montrent que le cytochrome b_5 présente de grandes analogies avec le noyau cytochromique b_2 du point de vue de ses propriétés spectroscopiques (26) et de sa séquence (56). Ici encore, il serait hautement significatif de trouver une parenté structurale entre ces deux cytochromes dont l'un provient d'une levure et l'autre d'un mammifère.

3) Dans le cytochrome b_2, une déshydrogénase et un cytochrome sont portés par une seule chaine. Très vraisemblablement, cette chaine unique (57 000 daltons) est formée de deux globules ; l'un porterait l'activité déshydrogénasique et l'autre l'activité cytochromique. C'est sans doute la partie de la chaine liant ces deux globules qui est le siège de l'attaque protéolytique que l'on observe au cours de la préparation. Nous avons donc ici un merveilleux modèle pour l'étude des interactions entre protéines : cristalliser le cytochrome b_2 revient à co-cristalliser un cytochrome de type b et la déshydrogénase qui lui est associée (et qui le précède dans la chaine respiratoire). Notons ici que F.S. Mathews, qui a déterminé la structure du cytochrome b_5, tente actuellement de cristalliser la cytochrome b_5 réductase (flavoprotéine couplée au système NAD/NADH) ; si ce travail aboutit, il y aurait là encore matière à de fructueuses comparaisons.

4) Dans le même ordre d'idée, il faut se rappeler que l'un des substrats du cytochrome b_2 est une protéine : le cytochrome c. Il n'est pas impossible d'envisager l'étude directe du complexe cytochrome b_2 -cytochrome c puisque celui-ci a déjà été obtenu à l'état cristallin (57). Les moyens techniques actuels ne permettent pas de soumettre à une investigation cristallographique un ensemble protéique aussi important ; cependant, l'utilisation de sources X très intenses (accélérateurs de particules) et de détecteurs électroniques bidimensionnels (en cours de réalisation) devraient permettre de mener à bien une telle étude. Ainsi, nous aurions un modèle pour les premières étapes de la chaine respiratoire : flavoprotéine - cytochrome b - cytochrome c.

On voit donc bien tout l'intérêt que présenterait la détermination de la structure du cytochrome b_2.

D'autres questions se posent encore, qui ne seront sans doute pas résolues de sitôt. On peut par exemple se demander quelle est l'origine du cytochrome b_2 ; si la partie cytochromique de cet enzyme présente réellement des similitudes avec le cytochrome b_5 des foies de mammifères -ce qui semble bien être le cas- il sera clair que ces deux enzymes ont été conservés au cours de l'évolution. A vrai dire, si l'on admet que le cytochrome b_5 et la partie hémoprotéique du cytochrome b_2 ont un précurseur commun, on peut comprendre pourquoi ces deux protéines présentent encore de grandes analogies (voir aussi la discussion de R.E. Dickerson au sujet du cytochrome c, ref 58).

1) Dans toutes les hémoprotéines connues, l'hème se trouve enfermé dans une crevasse dont les parois sont tapissées de résidus hydrophobes. Par analogie avec le cytochrome c (59), on peut penser que ces résidus, situés au voisinage immédiat de l'hème, sont indispensables à l'activité catalytique. Toute mutation touchant ces résidus risque donc de produire un enzyme inactif, et ne sera pas conservée.

2) Les résidus situés à la surface de la protéine, généralement hydrophiles, sont moins essentiels pour l'intégrité de la structure protéique. Cependant, aussi bien pour le cytochrome b_2 que pour le cytochrome b_5, la surface de l'enzyme a une grande importance. En effet, les substrats de ces deux cytochromes sont des protéines : d'une part la cytochrome réductase et d'autre part la cytochrome oxydase. La cytochrome b_5 réductase est un flavoprotéine que l'on a pu isoler et étudier (63) ; la "cytochrome b_2 réductase" est la partie flavinique de cet enzyme complexe (vraisemblablement, l'association dans le cytochrome b_2 d'une flavoprotéine et d'une hémoprotéine résulte d'une fusion de gènes. Cela ne change rien au fait que l'interaction entre ces deux "globules" doit être conservée) ; la cytochrome b_5 oxydase est inconnue -mais existe sûrement- et la cytochrome b_2 oxydase est vraisemblablement le cytochrome c. Ainsi, le fonctionnement de chacun de ces cytochromes implique la reconnaissance de deux protéines différentes ; autrement dit la quasi totalité de la surface protéique constitue un "site actif". Il est claire qu'une mutation touchant un résidu situé à l'extérieur de la molécule risque d'abolir la reconnaissance avec la réductase ou l'oxydase.

3) Le cytochrome b_2 et le cytochrome b_5 sont des enzymes membranaires (60, 61, 62). Une partie de leur surface est donc en interaction avec la membrane de la mitochondrie ou du réticulum endoplasmique. Ceci implique l'existence d'un autre site de reconnaissance qui doit, lui aussi, être conservé.

4) Enfin le cytochrome b_2 est un oligomère; les régions de contact entre les protomères constituent donc de nouveaux sites importants que toute mutation risquerait d'altérer.

On voit donc que les structures de ces cytochromes ont toutes raisons d'être hautement conservatives. Il serait donc fort intéressant de rechercher et d'étudier systématiquement les cytochromes du type b_2 et b_5 extraits de différents organismes : levures, plantes, animaux supérieurs. Il est fort probable que l'on pourrait aussi établir un arbre phylogénique très étendu (de la levure aux mammifères) comme cela a été fait grâce à l'étude systématique du cytochrome c (58). La comparaison des deux arbres phylogéniques ainsi obtenus permettrait sûrement d'accroitre considérablement notre connaissance de l'évolution.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES HORS ARTICLES

1 - Bernheim, F., Biochem. J. 22 (1928) 1178.

2 - Bach, S.J., Dixon, M., et Zerfas, G., Biochem. J. 40 (1946) 229.

3 - Appleby, C.A., et Morton, R.K., Nature, 173 (1954) 749.

4 - Boeri, E., Cutolo, E., Luzzati, M., et Tosi, L., Arch. Biochem. Biophys. 56 (1955) 487.

5 - Slonimski, P.P., Formation des Enzymes Respiratoires chez la Levure, Masson, Paris, 1953.

6 - Slonimski, P.P., et Tysarowski, W., C. R. Acad. Sci. 246 (1958) 1111.

7 - Labeyrie, F., Slonimski, P.P., et Naslin, L., Biochim. Biophys. Acta, 34 (1959) 262.

8 - Nygaard, A.P., Biochim. Biophys. Acta, 40 (1960) 85.

9 - Lachowicz, T., Gorman, J., et Zelikson, R., Résultats non publiés.

10 - Somlo, M., Biochim. Biophys. Acta, 65 (1962) 333.

11 - Somlo, M., Biochim. Biophys. Acta, 97 (1965) 183.

12 - Somlo, M., et Fukuhara, H., Biochem. Biophys. Res. Comm. 19 (1965) 587.

13 - Somlo, M., Bull. Soc. Chim. Biol. 48 (1966) 247.

14 - Somlo, M., et Slonimski, P.P., Bull. Soc. Chim. Biol. 48 (1966) 1221.

15 - Labeyrie, F., et Slonimski, P.P., Bull. Soc. Chim. Biol. 46 (1964) 1793.

16 - Labeyrie, F., Bull. Soc. Franç. Physiol. Vég. 12 (1966) 17.

17 - Baudras, A., Bull. Soc. Chim. Biol. 47 (1965) 1449.

18 - Baudras, A., Biochem. Biophys. Res. Comm. 7 (1962) 310.

19 - Blandin-Capeillère, C., F.E.B.S. Letters, 4 (1969) 311.

20 - Iwatsubo, M., Baudras, A., di Franco, A., Capeillère, C., et Labeyrie, F., in "Flavins and Flavoprotéins" (Yagi, K., ed.), University Park Press, Manchester 1968, p. 41.

21 - Blandin-Capeillère, C., Résultats non publiés.

22 - Morton, R.K., et Sturtevant, J.M., J. Biol. Chem. 239 (1964) 1614.

23 - Forestier, J.P., et Baudras, A., in "Flavins and Flavoproteins" (Kamin, H., ed.), University Park Press, Baltimore, et Butterworths, Londres 1971, p. 599.

24 - Mével-Ninio, M., et Labeyrie, F., Résultats non publiés.

25 - Watari, H., Groudinsky, O., et Labeyrie, F., Biochim. Biophys. Acta, 131 (1967) 592.

26 - Groudinsky, O., Thèse de Doctorat, Paris, 1972.

27 - Groudinsky, O., Eur. J. Biochem. 18 (1971) 480.

28 - Groudinsky, O., Keller, R., et Wuthrich, K., Résultats non publiés.

29 - Armstrong, J.Mc.D., Coates, J. H., et Morton, R.K., Biochem. J. 86 (1963) 136.

30 - Appleby, C.A., et Morton, R.K., Biochem. J. 73 (1959) 539.

31 - Baudras, A., Bull. Soc. Chim. Biol. 47 (1965) 1143.

32 - Morton, R.K., Armstrong, J.McD., et Appleby, C.A., in "Haematin Enzymes" (Falk, J.E., Lemberg, R., et Morton, R.K., eds), Pergamon Press, Londres 1961, p. 501.

33 - Labeyrie, F., di Franco, A., Iwatsubo, M., et Baudras, A., Biochemistry, 6 (1967) 1791.

34 - Pajot, P., et Groudinsky, O., Eur. J. Biochem. 12 (1970) 158.

35 - Jacq, C., et Lederer, F., Eur. J. Biochem. 12 (1970) 154.

36 - Morton, R.K., et Shepley, K., Biochem. J. 89 (1963) 267.

37 - Mc Meekin, T.L., Groves, M.L., et Hipp, N.J., J. Am. Chem. Soc. 71 (1949) 3298.

38 - Perutz, M.F., Disc. Faraday Soc. B. 42 (1946) 187.

39 - Mével-Ninio, M., Eur. J. Biochem. 25 (1972) 254.

40 - Iwatsubo, M., et di Franco A., in "Structure and Function of Cytochromes" (Okunuki, M., Kamen, M.D., et Sekuzu, I., eds.), University Park Press, Manchester 1968, p. 613.

41 - cf. ref. 20

42 - Urry, D.W., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 54 (1965) 640.

43 - Miles, D.W., and Urry, D.W., Biochemistry, 7 (1968) 2791.

44 - Djerassi, C., Bunnenberg, E., et Elder, D.L., Pure Appl. Chem. 25 (1971) 57.

45 - Briat, B., et Djerassi, C., Nature, 217 (1968) 918.

46 - Buckingham, A.D., et Stephens, P.J., Ann. Rev. Phys. Chem. 17 (1966) 399.

47 - Jacq, C., and Lederer, F., Eur. J. Biochem. 25 (1972) 41.

48 - Lederer, F., et Simon, A.M., Eur. J. Biochem. 20 (1971) 469.

49 - Baudras, A., et Spyridakis, A., Biochimie, 53 (1971) 943.

50 - Jacq, C., et Labeyrie, F., Communication Personnelle.

51 - Watenpaugh, K.D., Sieker, L.C., Jensen, L.H., Legall, J., et Dubourdieu, M., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69 (1972) 3185.

52 - Andersen, R.D., Apgar, P.A., Burnett, R.M., Darling, G.D., Lequesne, M.E., Mayhew, S.G., et Ludwig, M.L., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69 (1972) 3189.

53 - Shotton, D.M., White, N.J., et Watson, H.C., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 36 (1971) 91.

54 - Mathews, F.S., Argos, P., et Levine, M., Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 36 (1971) 387.

55 - Mathews, F.S., Levine, M., et Argos, P., J. Mol. Biol. 64 (1972) 449.

56 - Guiard, B., et Lederer, F., Résultats non publiés.

57 - Baudras, A., Krupa, M., and Labeyrie, F., Eur. J. Biochem. 20 (1971) 58.

58 - Dickerson, R.E., J. Molec. Evolution 1 (1971) 26.

59 - Dickerson, R.E., Takano, E., Eisenberg, D., Kallai, O.B., Samson, L., Cooper, A., et Margoliash, E., J. Biol. Chem. 246 (1971) 1511.

60 - Somlo, M., Thèse de Doctorat, Paris, 1967.

61 - Fukushima, K., Ito, A., Omura, T., et Sato, R., J. Biochem. (Japon) 71 (1972) 447.

62 - Sottocasa, G.L., Kuylenstierna, B., Ernster, L., et Bergstrand, A., J. Cell. Biol. 32 (1967) 415.

63 - Strittmatter, P., in "Flavins and Flavoproteins" (Yagi, K., ed.), University Park Press, Manchester 1968, p.85.

1072

UNIVERSITE DE PARIS-SUD

CENTRE D'ORSAY

PERMIS D'IMPRIMER

Doctorat d'ETAT

Thèse de SCIENCES PHYSIQUES (chimie)

Nom RISLER

Prénoms Jean-Loup

Date et lieu de naissance 30 Avril 1943 à SAINT-HILAIRE (Isère)

SUJET :

Thèse : " Structure quaternaire et relations spatiales entre les groupes prosthétiques d'une flavohémoptrotéine: la L-lactate deshydrogenase (cytochrome b_2) de la levure".

Vu et approuvé :

Orsay, le 5 Février 1973

Le Vice-Président du Centre d'Orsay :

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données

Vu et approuvé :

Orsay, le 5 Février 19 73

Le Vice-Président du Centre d'Orsay :

M. STEINBERG.

Service de Reprographie
C . N . R . S .
Gif